ISSN 0181-1584

CRYPTOGAMIE

MYCOLOGIE

TOME 14 Fascicule 3 1993



PUBLICATION TRIMESTRIELLE
AVEC LE CONCOURS DU MUSEUM NATIONAL D'HISTOIRE NATURELLE

Septembre 1993

CRYPTOGAMIE
Mycologie

ANCIENNE REVUE DE MYCOLOGIE
Fondée par R. Heim en 1936

Directeur scientifique: Mme J. Nicot
Secrétaire de Rédaction: M. Bruno Dennetière
Editeur: A.D.A.C. - 12 rue Buffon F-75005 Paris.

MANUSCRITS

Les manuscrits doivent être adressés directement à un membre du Bureau de Rédaction, choisi pour sa spécialité. Le Bureau peut demander l'avis d'un lecteur, même s'il n'appartient pas au Comité de Lecture. Bien qu'étant une revue de langue française, les articles rédigés en anglais, allemand, italien et espagnol sont acceptés. Les disquettes de micro-ordinateur (IBM, IBM compatible, et MacIntosh) sont vivement souhaitées. Les recommandations aux auteurs sont publiées dans le fascicule 1 de chaque tome. Les auteurs recevront 25 tirés-à-part gratuits; les exemplaires supplémentaires seront à leur charge.

TARIFS DES ABONNEMENTS Tome 15, 1994

CRYPTOGAMIE comprend trois sections: Algologie, Bryologie-Lichénologie, Mycologie.

Pour une section:	France: (326 F ht) 332,85 F ttc	-	Étranger: 357,00 F
Pour les 3 sections:	France: (918 F ht) 937,28 F ttc	-	Étranger: 1000,00 F

Paiement par chèque bancaire ou postal à l'ordre de:
A.D.A.C. - CRYPTOGAMIE (CCP La Source 34 764 05 S),
adressé à: A.D.A.C. 12, rue Buffon, F-75005 Paris.

CRYPTOGAMIE, Mycologie est indexé par *Biological Abstracts, Current Contents*, Publications bibliographiques du CNRS (Pascal).

CRYPTOGAMIE

MYCOLOGIE

TOME 14 FASCICULE 3 1993

CONTENTS

CARACTÉRISATION DES MYCORHIZES DE DIFFÉRENTS *TUBER* PAR L'ÉTUDE DU POLYMORPHISME ENZYMATIQUE

Chantal DUPRE*, Gérard CHEVALIER*, Mario PALENZONA** et Ettore BIOCCA***

* Station d'Agronomie et de Mycologie, Unité de Mycologie, I.N.R.A., 12 avenue du Brézet, 63039 Clermont-Ferrand Cedex, France.
** Istituto per le Piante da Legno e l'Ambiente (I.P.L.A.), corso Casale 476, 10132 Turin, Italie.
*** Université "La Sapienza", Istituto di Parassitologia, Rome, Italie.

RÉSUMÉ - L'étude du polymorphisme enzymatique dans les mycorhizes de différents *Tuber* montre que l'activité enzymatique de la glutamate-déshydrogénase à NADP constitue un critère sûr de différenciation. Ce critère biochimique est intéressant pour identifier le symbiote fongique, lorsque des espèces différentes de *Tuber* présentent des mycorhizes morphologiquement identiques (*T. aestivum* - *T. uncinatum*) ou très voisines (*T. melanosporum* - *T. brumale*).

ABSTRACT - A study of the enzymatic polymorphism in the ectomycorrhizas of several *Tuber* species has shown that the enzymatic activity of the NADP - dependent GDH is a reliable criterion of discrimination. This biochemical criterion is interesting for identifying the fungal symbiot, when different *Tuber* species exhibit mycorrhizas with a quite similar morphology (e.g. *T. aestivum* - *T. uncinatum*) or nearly so (for example *T. melanosporum* - *T. brumale*).

MOTS CLÉS : *Tuber*, ectomycorhizes, analyse électrophorétique, variabilité enzymatique.

INTRODUCTION

L'analyse électrophorétique de certaines protéines à fonction enzymatique peut s'avérer un outil intéressant pour différencier les espèces fongiques, qu'il s'agisse de *Tuber* (Palenzona et al., 1988) ou d'autres genres (Yoon et al., 1990; Perreau et al., 1992).

Dans un travail précédent, Dupré & Chevalier (1991) ont démontré que la composition protéinique des mycéliums de *Tuber* en culture pure ou en association avec le noisetier (*Corylus avellana* L.) s'avérait un critère hautement spécifique en taxonomie; toutefois, la technique de l'électrophorèse des protéines totales n'a pas permis de mettre en évidence des groupes de polypeptides fongiques communs au mycélium en culture et au mycélium associé à la racine.

Le polymorphisme enzymatique s'est également révélé un critère d'une haute spécificité. Palenzona et al. (1988), puis Pacioni & Pomponi (1989) ont montré qu'il était possible d'utiliser les systèmes "gène-enzyme" pour différencier les espèces de



Tuber à partir des ascocarpes. Dupré et al. (1992) ont appliqué la même méthode à l'étude des mycéliums en culture et prouvé qu'avec les systèmes enzymatiques utilisés (MDH, IDH, 6 PGDH, SOD, GOT, PGM, MPI et PGI), les patterns obtenus étaient identiques à ceux des ascocarpes; par contre, il ne leur a pas été possible de mettre en évidence les isoenzymes du champignon à l'état symbiotique.

Des essais ultérieurs avec les systèmes GDH à NAD, ACP et estérases ont donné des résultats, soit négatifs (GDH à NAD), soit difficiles à interpréter, par suite du manque de netteté des bandes (ACP et estérases).

Finalement, grâce à l'utilisation du système GDH à NADP, qui avait donné des résultats intéressants sur épicéa mycorhizé par *Hebeloma* sp. (Dell et al., 1989), nous avons pu "marquer" notre champignon en association avec la racine.

L'objectif de ce travail est de décrire la technique qui a permis de caractériser les mycorhizes de *Tuber* avec ce système et de montrer son intérêt en systématique et comme outil de contrôle de la mycorhization.

MATÉRIEL ET MÉTHODE

1/ Matériel végétal

L'inoculation et l'élevage de plantules de *Corylus avellana* L., ainsi que les prélévements de mycorhizes ont été effectués selon les techniques décrites par Dupré & Chevalier (1991).

2/ Matériel fongique

Six espèces de *Tuber* ont été étudiées, représentées par vingt deux individus: *T. aestivum* Vitt. (Truffe d'été), une truffe, provenant de Provence (région d'Aix en Provence); *T. albidum* Pico ("Blanquette"), quatre truffes, provenant de Toscane (région de Grosseto, Italie); *T. brumale* Vitt., trois truffes, provenant du Périgord (région de Bergerac); *T. melanosporum* Vitt. (T. du Périgord), sept truffes provenant du Périgord (région de Bergerac, cinq truffes), des Marches (région de Fabriano, Italie, une truffe) et de Provence (région des Baux de Provence, une truffe); *T. rufum* Pico ("nez de chien"), une truffe provenant d'Auvergne (région de Clermont-Ferrand); *T. uncinatum* Ch. (Truffe de Bourgogne), six truffes provenant de Lorraine (région de Commercy, une truffe) et de Bourgogne (région de Tonnerre, cinq truffes).

Les prélèvements de gléba ont été faits sur des ascocarpes frais ou congelés conservés à -80°C, après congélation dans l'azote liquide.

Les cultures mycéliennes ont été réalisées selon la méthode décrite par Dupré & Chevalier (1991).

3/ Extraction des protéines

Dans le cas des cultures mycéliennes et des ascocarpes, l'extraction des protéines est effectuée à partir de 350 à 400 mg de matériel fongique (Dupré et al., 1992); dans le cas des mycorhizes, à partir de 150 à 200 apex mycorhizés. Les mycorhizes sont conservées, après nettoyage, 24 heures dans 1 ml d'eau désionisée stérile à 4°C. Durant ce temps, nous avons remarqué un léger développement dans l'eau du mycélium frangeant des mycorhizes. Ceci nous a permis d'augmenter sensiblement la quantité de mycélium par rapport au matériel végétal.

Les mycorhizes sont récupérées sur papier filtre Whatman puis déposées dans un mortier. Elles sont broyées dans de l'azote liquide en présence de PVP (polyclar, 10% et PVP 40, 2%) et de sable de Biot. On ajoute 500 µl de solution d'extraction (Chalot et al., 1989): Tris-HCl, 50 mM (pH 8); glycérol, 10%; béta mercaptoéthanol, 14 mM (1µl/ml); glutamate, 10 mM; $MgSO_4$, 10 mM; EDTA, 2 mM; PMSF, 1mM. Le dosage de la quantité de protéines est réalisé à l'aide du réactif préconisé par Biorad d'après la technique de Bradford (1976). Après une centrifugation à 10 000 g pendant 2 minutes, on récupère le surnageant contenant les protéines. Les extraits sont conservés dans des tubes cryogéniques à l'ultracongélateur à -80°C ou dans l'azote liquide.

4/ Electrophorèse

L'électrophorèse monodimensionelle en système discontinu, sur gels uniformes de polyacrylamide, en conditions non dénaturantes, est réalisée verticalement en minicuve "Mini Protean II" Biorad. Les dimensions des gels sont de: 8 x 7,3 x 0,075 cm.

Le gel de séparation est coulé sur une hauteur de 5,5 cm.

- Composition du gel à 6% de polyacrylamide (Botton et Chalot, 1991): Solution A (acrylamide, 30 g; bisacrylamide, 0,8 g; eau permutée, qsp 100 ml), 2,0 ml; Tris 1M (pH 8,8), 3,5 ml; ammonium persulfate 1,5%, 0,5 ml; TEMED, 10 µl; eau permutée, 3,8 ml.

- Composition du gel de concentration à 1,5% de polyacrylamide: Solution B (acrylamide, 10,0 g; bisacrylamide, 2,5 g; eau permutée, qsp 100 ml), 1,2 ml; Tris 1M (pH 6,8), 0,5 ml; ammonium persulfate, 0,2 ml; eau permutée, 2,1 ml.

Après polymérisation du gel de séparation, le gel de concentration est coulé et un peigne de 10 puits destinés à contenir les dépôts protéiques y est inséré. Avec une microseringue, on dépose 30 µl d'extrait contenant de 9 à 12 µg de protéines dans chacun des 10 puits. Le tampon de migration électrophorétique en conditions non dénaturantes a la composition suivante: Tris, 2 g; glycine, 9,6 g; eau permutée, qsp 1 litre.

L'électrophorèse se déroule à voltage constant (180 volts) pendant 50 minutes à 4°C.

5/ Révélation enzymatique

La solution de révélation de la glutamate déshydrogénase à NADP est la suivante:

Tampon Tris-HCl (pH 8), 40 ml; L glutamate, 224 mg; NBT, 32 mg; PMS, 56 mg; NADP, 15 mg (Blumenthal & Smith, 1973).

Le gel immergé dans la solution de révélation est placé dans une étuve à 37°C pendant 45 minutes à 1 heure. Des taches bleues apparaissent; elles correspondent à la formation d'un précipité de formazan. Une autre série de taches claires apparaissent également; il s'agit d'une réaction SOD (superoxyde-dismutase) fréquente dans les colorations utilisant le "système tétrazolium".

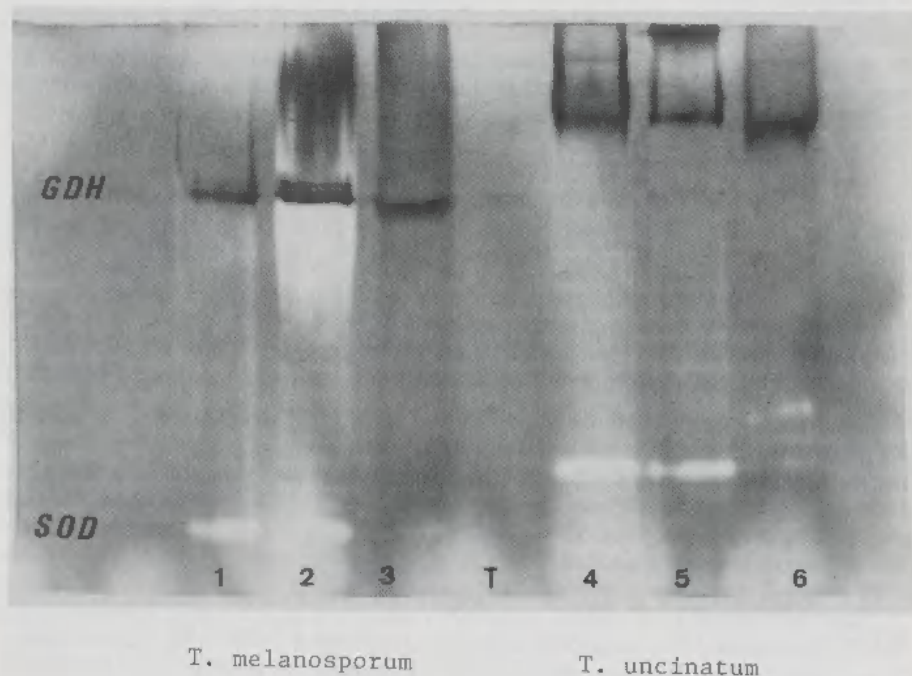
Dès l'apparition des taches bleues, on rince à l'eau permutée et on fixe la coloration. Composition du fixateur: acide acétique, 100 ml; glycérol, 100 ml; eau permutée, qsp 1 litre.

RÉSULTATS

1/ Polymorphisme enzymatique dans les ascocarpes, les cultures mycéliennes et les mycorhizes de *T. melanosporum* et *T. uncinatum*.

Les profils présentés sur la figure 1 (provenant chacun d'individus différents) montrent qu'au sein d'une même espèce, la mobilité électrophorétique de la GDH à NADP est identique; il en est de même pour celle de la SOD; par contre, entre espèces, le polymorphisme est suffisant pour permettre une différenciation nette.

Nous n'avons pas observé de bande dans la piste (T) correspondant aux racines non mycorhizées.



T. melanosporum T. uncinatum

Fig. 1 - Zymogrammes de la GDH à NADP et de la SOD dans les ascocarpes, les cultures mycéliennes et les mycorhizes de *T. melanosporum* et *T. uncinatum* (*T. melanosporum*: 1, ascocarpe, Provence; 2, mycélium en culture, Marches; 3, mycorhizes sur *C. avellana*, Périgord - *T. uncinatum*: 4, ascocarpe, Lorraine; 5, mycélium, Bourgogne; 6, mycorhizes, Bourgogne; T, racine témoin non mycorhizée).

Fig. 1 - Electrophoretic patterns for NADP-GDH and SOD in ascocarps, mycelial cultures and mycorrhizas of *T. melanosporum* and *T. uncinatum* (*T. melanosporum*: 1, ascocarp, Provence; 2, mycelial culture, Marches; 3, *C. avellana* mycorrhizas, Perigord - *T. uncinatum*: 4, ascocarp, Lorraine; 5, mycelium, Burgundy; 6, mycorrhizas, Burgundy; T, non mycorrhized root).

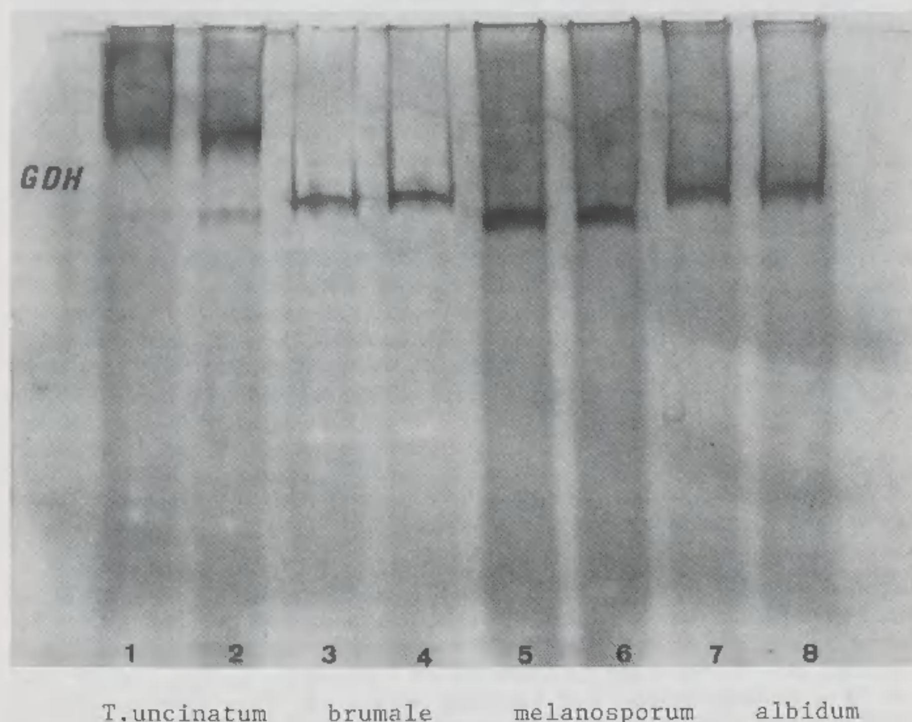
2/ Polymorphisme enzymatique dans les mycorhizes de différentes espèces de *Tuber* avec *Corylus avellana*.

Les profils des figures 2 et 3 (provenant, comme ceux de la figure 1, d'individus différents) confirment la possibilité de différencier les espèces entre elles, alors que, dans une même espèce, les distances de migration des taches montrent une remarquable homogénéité. Nous avons calculé, pour la GDH à NADP, les moyennes des Rf pour corriger les effets de différences dues à la lecture sur plusieurs gels. Les moyennes ont été effectuées de la façon suivante:

$$Rf = \frac{3(Rfc) + 3(Rfa) + 3(Rfm)}{9}$$

avec: Rfc = valeur correspondant à la bande révélant la GDH à NADP pour les cultures mycéliennes; Rfa = idem pour les ascocarpes; Rfm = idem pour les mycorhizes; 3 et 9 = nombre de répétitions.

Les Rf des bandes révélant la GDH à NADP, pour les espèces de *Tuber* représentées sur la figure 2, ont les valeurs suivantes:



T.uncinatum brumale melanosporum albidum

Fig. 2 - Zymogrammes de la GDH à NADP dans les mycorhizes de quatre espèces de *Tuber* avec *C. avellana* (1 et 2: *T. uncinatum*, Bourgogne; 3 et 4: *T. brumale*, Périgord; 5 et 6: *T. melanosporum*, Périgord; 7 et 8: *T. albidum*, Toscane).

Fig. 2 - Electrophoretic patterns for NADP-GDH in mycorrhizas of four *Tuber* species with *C. avellana* (1 and 2: *T. uncinatum*, Burgundy; 3 and 4: *T. brumale*, Perigord; 5 and 6: *T. melanosporum*, Perigord; 7 and 8: *T. albidum*, Tuscany).



Fig. 3 - Zymogrammes de la GDH à NADP dans les mycorhizes de six espèces de *Tuber* avec *C. avellana* (1 et 2: *T. albidum*, Toscane; 3: *T. melanosporum*, Périgord; 4: *T. uncinatum*, Bourgogne; 5: *T. aestivum*, Provence; 6: *T. brumale*, Périgord; 7: *T. melanosporum*, Périgord; 8: *T. rufum*, Auvergne).

Fig. 3 - Electrophoretic patterns for NADP-GDH in mycorrhizas of six *Tuber* species with *C. avellana* (1 and 2: *T. albidum*, Tuscany; 3: *T. melanosporum*, Perigord; 4: *T. uncinatum*, Burgundy; 5: *T. aestivum*, Provence; 6: *T. brumale*, Perigord; 7: *T. melanosporum*, Perigord; 8: *T. rufum*, Auvergne).

T. uncinatum, 0,271; *T. brumale*, 0,410; *T. melanosporum*, 0,471; *T. albidum*, 0,433.

Certaines espèces proches dans la systématique, telles *T. uncinatum* et *T. aestivum* ont une bande majeure semblable (fig. 3). *T. uncinatum* possède une bande fine supplémentaire (visible sur la fig. 2); chez *T. melanosporum* et *T. brumale*, les distances de migration de la GDH à NADP sont voisines, mais celles de la SOD sont beaucoup plus discriminantes. Les distances de migration de la GDH à NADP chez ces deux dernières espèces sont également voisines de celles observées chez *T. albidum*, espèce pourtant éloignée sur le plan taxonomique.

DISCUSSION ET CONCLUSION

Parmi les 12 systèmes enzymatiques étudiés, seule la GDH-NADP a permis de mettre en évidence de manière constante une activité enzymatique à partir des mycorhizes de *Tuber*; la SOD a donné des résultats plus irréguliers.

Le rôle clé de la GDH dans l'assimilation de l'azote ammoniacal dans les mycorhizes d'épicéa a été clairement mis en évidence par Dell et al. (1989). Ces auteurs ont démontré que, dans des extraits bruts de mycorhizes d'*Hebeloma* sp. sur épicéa (*Picea excelsa* L.) de deux ans, 85% de l'activité totale de la GDH sont dus à la GDH à NADP du champignon; au contraire, la GDH fongique est fortement réprimée *in vitro* dans les mycorhizes du hêtre (*Fagus sylvatica* L.) avec *Hebeloma crustuliniforme* (Bull. ex St Amans) et *Paxillus involutus* (Batsch ex Fr) Fr. La présence de GDH à NADP dans les extraits de mycorhizes d'épicéa suggère que l'ammonium absorbé par les mycorhizes est d'abord assimilé par la GDH à NADP dans les tissus de l'hôte pour produire du glutamate qui pourrait par la suite être catalysé par la glutamine-synthétase (GS) du champignon, avant d'être transporté comme glutamine vers les cellules de la plante.

Chez les *Tuber*, les profils obtenus avec les ascocarpes, les cultures mycéliennes et les mycorhizes donnent la même réponse, pour une espèce de *Tuber* donnée.

Les résultats obtenus dans cette étude confirment, mais complètent également ceux publiés en 1992 par Dupré et al.; en effet, jusqu'ici, la caractérisation des mycorhizes ne pouvait être obtenue que par une voie indirecte consistant à réaliser l'électrophorèse des isoenzymes sur les cultures de mycélium isolé à partir des mycorhizes; dans le travail présenté ici, l'analyse est effectuée directement sur les mycorhizes, ce qui simplifie fortement la technique.

La forte affinité entre les profils électrophorétiques de *T. aestivum* et *T. uncinatum* confirme les résultats obtenus en 1992 par Gandeboeuf, dans une étude menée sur la différenciation des deux taxons par l'analyse des isoenzymes des ascocarpes et des cultures mycéliennes.

L'analyse électrophorétique des isoenzymes présentes dans les mycorhizes des *Tuber* fournit donc un outil extrêmement intéressant de contrôle biochimique de la mycorhization des plants, lorsqu'une forte convergence de la morphologie des mycorhizes rend difficile l'identification du symbiote fongique par les méthodes classiques: c'est le cas pour *T. aestivum* - *T. uncinatum* et *T. albidum* - *T. magnatum*. Ces deux derniers *Tuber* font actuellement l'objet d'une recherche spécifique, en collaboration avec le Département de Génétique et Biologie moléculaire de l'Université "La Sapienza" de Rome.

REMERCIEMENTS

Ce travail a bénéficié d'une subvention européenne dans le cadre du Plan d'intégration méditerranéen et du projet "Relance de la trufficulture en Aquitaine".

BIBLIOGRAPHIE

BLUMENTHAL K.M. and SMITH E.L., 1973 - Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-specific glutamate dehydrogenase of *Neurospora*. I. Isolation, subunits, amino acid composition, sulfhydryl groups, and identification of a lysine residue reactive with pyridoxal phosphate and N-ethyl-maleimide. *J. Biol. Chem.* 248: 6002-6008.

BOTTON [redacted]. and CHALOT M., 1991 - Techniques for the study of nitrogen metabolism in ectomycorrhiza. *In:* J.R. Norris, D.J. Read & A.K. Warna, *Methods in microbiology* 23, New-York, Academic press: 203-252.

BRADFORD M.M., 1976 - A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochem.* 72: 248-254.

CHALOT M., BRUN A. and BOTTON B., 1989 - Occurrence and distribution of the fungal NADP-dependent glutamate dehydrogenase in spruce and beech ectomycorrhizas. *In:* D. Werner & P. Müller, *Fast growing trees and nitrogen fixing trees.* Stuttgart, New York, Gustav Fischer: 324-327.

DELL B., BOTTON B., MARTIN F. and LE TACON F., 1989 - Glutamate dehydrogenases in ectomycorrhizas of spruce (*Picea excelsa* L.) and beech (*Fagus sylvatica* L.). *New Phytol.* 111: 683-692.

DUPRE C. et CHEVALIER G., 1991 - Analyse électrophorétique des protéines fongiques de différents *Tuber* en association ou non avec *Corylus avellana*. *Cryptogamie, Mycol.* 12: 243-250.

DUPRE C., CHEVALIER G., PALENZONA M., FERRARA A.M., NASCETTI G., MATTIUCCI S., D'AMELIO S., LA ROSA G. ■ BIOCCA E., 1992 -Differenzazione genetica di ascocarpi, miceli e micorrize di differenti specie di *Tuber*. *In:* Compt. Rend. Congr. Internatl. sur la truffe (l'Aquila, 5-8 mars 1992): 145-159 (sous presse).

GANDEBOEUF D., 1992 - Différenciation de deux taxons de *Tuber* par l'analyse des isoenzymes. Mémoire de stage de maîtrise, Université de Clermont-Fd II, 25 p.

PACIONI G. and POMPONI G., 1989 - Chemotaxonomy of some italian species of *Tuber*. *Micol. Veget. Medit.* 4: 63-72.

PALENZONA M., BIOCCA E., NASCETTI G., FERRARA A.M., MATTIUCCI S., D'AMELIO S. ■ BALBO T., 1988 - Studi preliminari sulla tipizzazione genetica (sistemi gene-enzima) di specie del genere *Tuber*. *In:* Compt. Rend. 2ème Congrès internatl. sur la truffe (Spoleto, 24-27 novembre 1988): 53-58.

PERREAU J., LAMBOURDIERE J. et BOISSELIER M.C., 1992 - *Mycena rosea* et le complexe *Mycena pura*. *Cryptogamie, Mycol.* 13: 247-251.

YOON C.S., GESSNER R.V. and ROMANO M.A., 1990 - Population genetics and systematics of the *Morchella esculenta* complex. *Mycologia* 82: 227-235.

MYCOFLORA ASSOCIATED WITH GREEN LEAVES AND LEAF LITTER OF *QUERCUS GERMANA*, *QUERCUS SARTORII* AND *LIQUIDAMBAR STYRACIFLUA* IN A MEXICAN CLOUD FOREST

Gabriela HEREDIA

Instituto de Ecología, Apartado Postal 63, 91000 Xalapa, Ver. México

ABSTRACT - The mycoflora of green leaves and leaf litter of *Quercus germana*, *Q. sartorii* and *Liquidambar styraciflua* was studied by damp chambers, isolations from surface-sterilized and washed leaf fragments. The three types of leaves shared ■ high fungal species percentage. Dominant species on green leaves were different from those on leaf litter. On green leaves, *Pestalotiopsis maculans* was the most frequently recorded species from the three leaf specimens. In decaying litter most of the fungi were sporadic and had low frequency of occurrence. Only the fungi *Beltrania rhombica*, *Codinaea assamica*, *Chalara alabamensis*, *Cryptophiale kakombensis*, *Cylindrocladium scoparium*, *Ellisiopsis gallesia* and *Subulispora procurvata* were detected throughout the decomposition process. *Beltrania rhombica* was the dominant fungus on *Q. germana* and *Q. sartorii* leaf litter and *C. scoparium* on *L. styraciflua* leaf litter. The general pattern of succession scheme was similar to that reported from leaves of other species of deciduous trees. The leaf litter fungi were characteristic of tropical ecosystems.

RÉSUMÉ - La mycoflore des feuilles vertes et de la litière de *Quercus germana*, *Quercus sartorii* et *Liquidambar styraciflua* a été étudiée à l'aide de chambres humides, et isolée des feuilles après stérilisation de la surface et lavages sériés de fragments. Les 3 sortes de feuilles partagent un grand pourcentage d'espèces fongiques. Les espèces dominantes sur les feuilles vertes sont différentes de celles de la litière. Sur les feuilles vertes, l'espèce la plus abondante est *Pestalotiopsis maculans*. Dans la litière en décomposition, la plupart des champignons sont sporadiques et peu abondants. Seules les espèces *Beltrania rhombica*, *Chalara alabamensis*, *Codinaea assamica*, *Cryptophiale kakombensis*, *Cylindrocladium scoparium*, *Ellisiopsis gallesiae* et *Subulispora procurvata* sont observées tout au long du processus de décomposition. *Beltrania rhombica* est le champignons le plus abondant sur la litière de *Q. germana* et *Q. sartorii* et *C. scoparium* sur celle de *L. styraciflua*. Le schéma général de succession des espèces est semblable à celui des feuilles d'arbres décidues. Les champignons de ces litières sont caractéristiques d'écosystèmes tropicaux.

KEY WORDS : Mycoflora, leaves, litter, *Quercus germana*, *Q. sartorii*, *Liquidambar styraciflua*, Mexico.

INTRODUCTION

Due to their saprophytic ability, fungal communities play an important role in the decomposition of plant and animal residues and therefore in the release of nutrients (Harley, 1971). In forests, leaves are the major components of litter (Jensen, 1974).

Long before leaves fall, the process of decay begins. Green leaves surfaces form suitable substrates for different kinds of saprophytic and parasitic fungi. When leaf abscission takes place and during leaf decomposition above the soil surface, one group of fungi may be replaced by another group. The sequential appearance of fungal species on plant residues is considered as a fungal succession. This phenomenon has been widely studied on many different substrates.

A detailed review of the studies dealing with fungal successions on leaf litter was published by Hudson (1968). Most work has been focused on temperate tree leaves like oak, birch, hazel, ash (Hering, 1965), beech (Hogg & Hudson, 1966) and poplar (Visser & Parkinson, 1975).

Little is known about the mycoflora and successional patterns on tropical plant residues. Hudson (1962) studied fungal succession on ageing leaves of sugar cane and Meredith (1962) isolated fungi on banana leaves. For wild tropical species, Kiffer et al. (1981) described the fungal succession throughout the decomposition of leaf litter of *Euperia falcata* in French Guyana and Rambelli et al. (1983) published an extensive study on the leaf litter fungi from a tropical rain forest in the South Western Ivory Coast.

In Mexico no studies on the green leaves and leaf litter mycoflora have so far been carried out. The cloud forest is interesting to be studied. The mixture of tropical and temperate tree species and the high accumulation of leaf litter make this kind of forest suitable for studies dealing with leaf litter fungi.

The aims of this work were: (a) to determine the mycoflora on green and decaying leaves of three dominant tree species (*Liquidambar styraciflua* L., *Quercus sartorii* Liemb., and *Quercus germana* Cham. et Schlecht) in a Mexican cloud forest, (b) to assess the frequency of the dominant fungal species in the leaf litter during decomposition, (c) to describe the fungal succession occurring during the decay of the leaf litter.

STUDY AREA

The study was performed in a cloud forest located within the "El Cielo" Biosphere Reserve in Northeastern Mexico. A detailed description of the site is given by Sosa (1987). The sampling area is at an altitude of 1200 m. The annual mean temperature is 13.8°C being highest in May (34.4°C) and lowest in January and February (-2.2°C), with a total annual rain-fall of 2522 mm. (Fig. 1) (Puig & Bracho, 1987).

Forest structure has been studied by Puig et al. (1987). *Liquidambar styraciflua* L., *Quercus sartorii* Liemb., *Quercus germana* Cham. et Schlecht and *Clethra pringlei* S. Watson are the dominant trees. Understorey includes ferns, mosses, hepatics and selaginellas.

Bracho & Puig (1987) studied litter production in several areas of the cloud forest. Litterfall biomass was estimated at 7.3 ton/ha/year, 5.6 ton/ha/year (76.7%) being composed of leaves. The species with the greatest contributions were the deciduous trees *Q. sartorii*, *Q. germana* and *L. styraciflua*. These authors reported two peaks of leaf fall, in January and November, but leaf fall may occur throughout the year due to frequent winds in this area. The litter layer on soil is 5 to 10 cm depth.

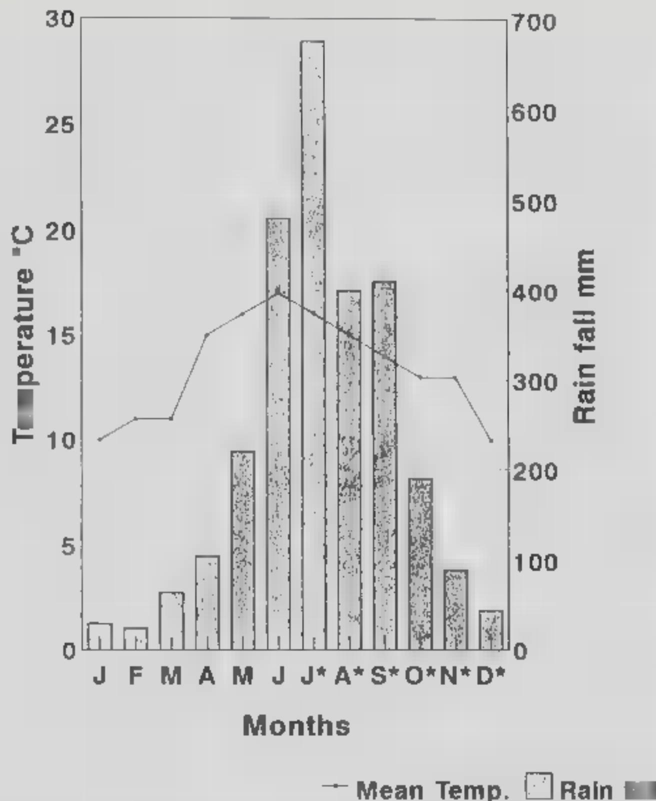


Fig. 1 - Mean monthly temperature and rainfall in study area. * Sample dates.

Fig. 1 - Moyenne mensuelle des températures et des précipitations de l'aire d'étude. * Date d'échantillonnage.

MATERIAL AND METHODS

Collection of leaf litter.

In July freshly fallen leaves of *Q. germana, Q. sartorii* and *L. styraciflua* were collected from the ground. Leaves were placed in litter bags (20 x 25 cm, 3 mm mesh) (Bocock & Gilbert, 1957). Each bag contained 20 leaves. For each type of leaf 30 litter bags were made up. The bags were deposited within three plots on top of the natural litter cover. Sampling dates were 30 Aug., 7 Oct., 28 Oct., 29 Nov., and 22 Dec. At each collection-date, two randomly choosen bags of each species were collected from each plot (six replicates). Samples were placed separately in sterile polyethylene bags and stored at 5°C before processing.

Leaf disks were punched from each leaf with a sterile cork borer of 5 mm diam. One half of each batch of disks was used for isolation in culture medium and the remainder was used for damp-chamber incubations.

Isolation in culture medium.

The isolations were carried out by means of serially washing of previously surface-sterilized leaf disks. This method was used to isolate fungi growing in the leaf tissues. Leaf disks were surface sterilized in sodium hypoclorite for 1 min and then washed 10 times with sterile water for 1 min. Between washings, the vials were completely drained. For each sample, 50 leaf disks were transferred to 10 Petri dishes containing potato-dextrose-agar (PDA) with 0.03 gr streptomycin (Ulloa & Hanlin, 1978).

Plates were incubated at 25°C and examined after 8 days. Representative isolations of fungal colonies were made for further identification.

Damp chamber incubation.

For each sample, 50 disks were distributed in 5 damp chambers. The chambers [redacted] sterile Petri dishes with filter papers, which were kept moistened by additions of sterilized water every 3-5 days. Incubation was at 25°C for 30 days. Microscopic examination was made by using pieces of double-adhesive tape (Langvard, 1980). Tapes were stained with lactophenol-cotton blue.

At the initiation of the study (in July), living green leaves were collected from the three tree species studied. Mycological observations were made by the same methods described for the leaf litter. For each tree species 500 leaves were collected, from which 250 disks were incubated in damp chambers and 200 were used for fungal isolations.

For each fungal species growing in damp-chambers and on PDA medium, the percentage frequency of occurrence defined as the number of leaf-disks on which fungus occurred / total number of disks plated x 100 was recorded.

Means of the percentage of occurrence for each fungus were calculated from the six replicates. The Mann-Whitney and Kruskall Wallis tests were applied to test for the significance of variation among sampling dates (Zar, 1974). The Sorensen Index was used to compare the similarity of the mycoflora composition of the three leaf species (Brower & Zar, 1977).

Isolates were identified by means of standard mycological methods (Barron 1968; Carmichael et al., 1980; Ellis, 1971, 1976; Glawe & Crane, 1987; Morgan-Jones & Ingram, 1976; Nag Raj & Kendrick, 1975; Nag Raj 1985; Nawawi & Kuthubutheen, 1987; Pirozynski, 1963; Rifai, 1969).

RESULTS

Table 1 shows the fungal species observed in damp chambers and isolated by serial washing. More species were detected by damp chambers than by cultural isolations. The percentage frequency of occurrence of the most representative fungal species for the three kinds of leaves studied are shown in Tables 3, 4 and 5.

Green leaves mycoflora.

The three types of leaves had many common fungal species (Table 2). Most of the species observed on green leaves disappeared in the leaf litter during the early stages of decomposition. Only the fungi *Beltrania rhombica* and *Pestalotiopsis maculans* were detected on green leaves [redacted] well as on leaves in early and late stages of decay.

SPECIES	GREEN LEAVES			LEAF LITTER			METHOD	
	Q.g.	Q.s.	L.s.	Q.g.	Q.s.	L.s.	A	B
Alternaria alternata (Fr.) Keissler	+	+	+	+	+	+	+	+
A. tenuissima (Kunze ex Pers.) Wiltshire	+	+	+	+	+	+	+	+
Aspergillus fumigatus Fres.	+	+	-	+	+	+	-	+
Aspergillus niger van Tieghem	-	-	-	+	+	+	+	+
Beltrania querna Harknes	+	+	-	+	+	-	+	-
Beltrania rhombica O. Penzig	+	+	+	+	+	+	+	+
Cercospora sp	+	+	+	-	-	+	+	-
Curvularia lunata (Wakker) Boedijn	+	+	+	-	-	+	+	-
Cylindrocladium scoparium Morgan	-	-	-	+	+	+	+	+
Cladosporium cladosporioides (Fresen.) de Vries	+	+	+	+	+	+	+	+
C. herbarum (Pers.) Link [illegible] S.F. Gray	+	+	+	+	+	+	+	+
Codinaea assamica (Agn.) Hughes et Kendrick	+	+	-	+	+	+	+	-
Codinaea simplex Hughes et Kendrick	-	-	-	+	+	-	+	-
Cryptophiale kakombensis Pirozynski	-	-	-	+	+	+	+	-
Chaetomium globosum Kunze:Fr.	-	-	-	+	+	+	-	+
Chalara alabamensis Morgan-Jones et Ingram	-	-	-	+	+	+	+	-
Chalara urceolata Nag Raj et Kendrick	-	-	-	+	+	-	+	-
Dactylella ellisospora (L.S.)	-	-	-	-	-	+	+	-
Dendrosporium lobatum (Plakidas et Edgerton)	-	-	-	-	-	+	+	-
Dictyosporium heptasporum (Garov.) Damon	-	-	-	+	-	-	+	-
Dipocladiella scalaroides Arnaud	-	-	-	+	-	+	+	-
Drechslera hawaiiensis Subram et Sain	-	-	-	+	+	+	+	+
Ellisiopsis gallesiae Batista et Nascimento	+	+	+	+	+	+	+	+
Epicoccum purpurascens Ehrenb	+	+	+	+	+	+	+	+
Fusarium s[illegible]	-	-	-	+	+	+	+	+
Humicola sp	-	-	-	+	-	-	+	-
Idriella lunata Nelson et Wilhelm	+	-	-	+	-	-	+	-
Menisporopsis theobromae Hughes	-	-	-	-	+	-	+	-
Monochaetia sp	-	-	+	-	-	-	+	-
Nigrospora sphaerica (Sacc.) Masson	-	-	-	-	+	-	+	-
Mucor hiemalis Wehmer	-	-	-	+	+	+	+	+
Olpitrichum macrosporum Atkinson	+	-	-	-	-	-	+	-
Penicillium spp	-	-	-	+	+	+	+	+
Pestalotiopsis maculans (Cda.) Hughes	+	+	+	+	+	+	+	+
Phialocephala sp	-	-	-	+	+	-	+	-
Phoma [illegible]	+	+	-	+	+	-	+	+
Pithomyces chartarum (Berk. et Curt.) Ellis	+	-	-	+	+	-	+	-
Rhinocladiella sp	-	+	+	-	-	-	+	-
Stachybotrys atra Corda	-	-	-	-	-	+	+	+
Subulispora procurvata Tubaki	-	-	+	+	+	+	+	-
Tetraploa aristata Berk [illegible] Br.	+	+	-	+	-	-	+	-
Trichoderma viride Pers.	-	-	-	+	+	+	+	+
Tripospermum myrti (Lind.) Hughes	+	+	+	-	-	-	+	-
Triscelosporium verrucosum Kawawi & Kuth	-	-	-	+	-	-	+	-
Tubakia dryina (Sacc.) Sutton	+	+	-	+	+	-	+	-
Verticillium spp	-	-	-	+	-	+	-	-

A= Moist chamber (chambre humide)   B= Washed disks (disques lavés)
+ present; - absent

Table 1 - Fungal species present on green leaves and leaf litter of *Quercus germana* (Q. g.), *Quercus sartorii* (Q. s.) and *Liquidambar styraciflua* (L. s.).

Tableau 1 - Champignons présents sur les feuilles vertes et la litière de *Quercus germana* (Q. g.), *Quercus sartorii* (Q. s.) et *Liquidambar styraciflua* (L. s.).

The most frequently recorded species on green leaves were *P. maculans* on *Q. germana* and *L. styraciflua*, and *Tubakia dryina* on *Q. sartorii* in damp chambers. In cultural isolations, *P. maculans* was the fungus with the highest percentage of occur-

rence for the three leaf species. The fungi restricted to green leaves were *Olpitrichum macrosporum* on *Q. germana*, *Rhinocladiella* sp. on *Q. sartorii*, and *L. styraciflua* and *Tripospermium myrti* on leaves of the three species.

Leaf litter mycoflora.

As with the green leaf mycoflora, a high percentage of shared species was observed on leaves of the three tree species (Table 2). Throughout the decomposition period, only a few species were present at all samplings. These species exhibited sharp changes in their frequency of occurrence from one date to the other.

Q. germana leaves suffered the least changes during decay, although leaves became progressively darker in color. After 104 days, many leaves showed few changes in shape, at the end of the study 60% of the samples were fragmented.

The fungi most frequently recorded on *Q. germana* fresh fallen leaves were *B. rhombica* and *S. procurvata* (Table 3). No significant difference was found in their frequency of occurrence (P= 0.388 Mann-Whitney U). On subsequent samplings, the fungus *B. rhombica* became the dominant species. Significative differences in its frequency of occurrence were found as decomposition advanced (P= 0.012 Kruskal-Wallis).

Q. sartorii leaves turned dark in very early decomposition stages and by the end of the study all leaves were fragmented. In Table 4 data of the mycoflora on *Q. sartorii* are presented. Like in *Q. germana*, on fresh fallen leaves and in early decomposition stages, *B. rhombica* was the most frequently recorded species.

In later samplings besides *B. rhombica*, the fungi *E. gallesiae* and *Ch. alabamensis* were the most prominent species. After 74 days there were no significant differences between *B. rhombica* and *E. gallesiae* (P= 0.500 Mann-Whitney U). At 102 days even though *Ch. alabamensis* showed higher percentages than *B. rhombica*, no significant difference was found in their frequency of occurrence (P= 0.196 Mann-Whitney U). During late stages of decay (134 and 157 days) *B. rhombica* was the dominant species again.

L. styraciflua leaves were the most susceptible to decay. The leaves darkened rapidly and most of the leaf material had disappeared by the end of the study. The dominant fungus on *L. styraciflua* was *C. scoparium* (Table 5). In intermediate decay stages, some species of *Fusarium* were observed. During late stages of decay, an increase in *Trichoderma viride* was observed on the isolation plates.

Tree leaf species	Green leaves	Leaf litter
Q. germana vs *Q. sartorii*	89%	86%
Q. germana vs *L. styraciflua*	75%	72%
L. styraciflua vs *Q. sartorii*	65%	73%

Table 2 - Similarity among the mycoflora of *Quercus germana*, *Quercus sartorii* and *Liquidambar styraciflua* green leaves and leaf litter, according to the Sorensen Index.

Tableau 2 - Similarité de la mycoflore entre feuilles vertes et de litière de *Quercus germana*, *Quercus sartorii* et *Liquidambar styraciflua* selon l'indice de Sorensen.

SPECIES	Green leaves A	Green leaves B	0* A	0* B	45 A	45 B	74 A	74 B	102 A	102 B	134 A	134 B	157 A	157 B
Alternaria spp	20	14	14	6	6	6	-	-	-	-	-	-	-	-
Beltrania rhombica	8	4	56	46	87	61	74	76	87	55	62	51	68	60
Cladosporium spp	27	13	23	6	6	4	-	-	-	-	-	-	-	-
Codinaea assamica	17	-	-	-	21	-	39	-	10	-	20	-	18	1
Cylindr. scoparium	-	-	10	5	18	9	6	11	6	5	8	12	-	12
Crypt. kakombensis	-	-	-	-	18	-	16	-	16	-	16	-	9	1
Chala. alabamensis	-	-	25	-	18	-	37	-	56	-	10	-	-	-
Ellisio. gallesiae	9	-	28	-	8	-	26	10	10	5	38	10	-	-
Epic. purpurascens	12	20	7	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fusarium spp	-	-	-	-	-	-	-	9	-	8	9	8	18	12
Mucor hiemalis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7	-	10	-	5
Penicillium spp	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10	8	7	19	16
Pestalot. maculans	44	28	25	17	-	14	-	7	-	7	-	5	-	-
Sub. procurvata	-	-	50	-	19	-	10	-	2	-	3	-	14	-
Trichoderma viride	-	-	-	-	15	27	11	45	7	36	9	38	27	38
Tubakia dryina	28	1	15	-	18	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Verticillium sp	-	-	-	-	-	-	-	-	2	-	-	-	28	16

■ Fresh fallen leaves
■ Feuilles récemment tombées

Table 3 - Percentage frequency of observed fungi in moist chambers (A) and isolated from disinfected-washed fragments (B) from green leaves and leaf litter of *Quercus germana*. Values are the average of six replicates. Only those species occurring with a frequency higher than 5% have been listed.

Tableau 3 - Pourcentage de fréquence des champignons observés dans les chambres humides (A) et isolés des fragments désinfectés-lavés (B) des feuilles vertes et de la litière de *Quercus germana*. Les valeurs sont la moyenne de 6 répétitions. Seules les espèces ayant une fréquence supérieure à 5% sont présentées.

SPECIES	Green leaves A	Green leaves B	0* A	0* B	45 A	45 B	74 A	74 B	102 A	102 B	134 A	134 B	157 A	157 B
Alternaria spp	14	11	17	3	9	6	6	-	-	-	-	-	-	-
Beltrania rhombica	9	-	61	42	80	42	55	52	48	27	64	33	87	27
Cladosporium spp	13	5	20	6	10	4	10	-	-	-	-	-	-	-
Codinaea assamica	5	-	-	-	16	-	16	-	24	-	27	-	26	-
Crypt. kakombensis	-	-	-	-	8	-	6	-	6	-	16	-	10	-
Cylindr. scoparium	-	-	-	14	3	15	5	5	12	7	10	5	10	7
Chala. alabamensis	-	-	-	-	12	-	30	-	68	-	47	-	67	-
Ellisio. gallesiae	10	-	13	-	28	-	59	-	45	-	20	-	-	-
Fusarium spp	3	3	4	3	16	10	-	-	-	-	11	3	8	7
Mucor hiemalis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8	-	9	-
Pestalot. maculans	16	28	-	3	4	5	11	5	10	3	4	1	11	7
Penicillium spp	-	-	-	-	-	-	-	3	-	7	-	3	-	18
Sub. procurvata	-	-	6	-	10	-	10	-	13	-	17	-	17	-
Trichoderma viride	-	-	-	6	-	13	13	20	26	30	17	25	10	57
Tubakia dryina	49	-	12	-	13	-	-	-	-	-	-	-	-	-

■ Fresh fallen leaves
* Feuilles récemment tombées

Table 4 - Percentage frequency of observed fungi in moist chambers (A) and isolated from disinfected-washed fragments (B) from green leaves and leaf litter of *Quercus sartorii*. Values are the average of six replicates. Only those species occurring with a frequency higher than 5% have been listed.

Tableau 4 - Pourcentage de fréquence des champignons observés dans les chambres humides (A) et isolés des fragments désinfectés-lavés (B) des feuilles vertes et de la litière de *Quercus sartorii*. Les valeurs sont la moyenne de [redacted] répétitions. Seules les espèces ayant une fréquence supérieure à 5% sont présentées.

SPECIES	Green leaves		TIME (Days)											
			0*		45		74		102		134		157	
	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
Alternaria spp	21	7	15	5	10	3	5	3	-	-	-	-	-	-
Asp. fumigatus	-	-	-	-	-	-	-	-	10	5	-	7	-	10
Beltrania rhombica	5	-	40	20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cladosporium spp	10	15	20	10	7	15	5	5	-	-	-	-	-	-
Codinaea assamica	-	-	-	-	6	-	2	-	29	-	33	-	-	-
Cylidro. scoparium	-	-	-	-	80	28	56	97	47	91	70	66	83	76
Chala. alabamensis	-	-	18	-	13	-	17	-	28	-	-	-	-	-
Ellisio. gallesiae	-	-	34	-	12	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Epic. purpurascens	17	-	4	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fusarium spp	-	-	-	-	26	19	18	20	15	10	9	12	-	-
Mucor hiemalis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	17	-	11	-
Penicillium spp	-	-	-	-	-	3	-	5	-	8	10	25	7	17
Pestalot. maculans	80	47	46	25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sub. procurvata	-	-	33	-	12	-	16	-	10	-	-	-	-	-
Trichoderma viride	-	-	-	-	-	17	-	14	32	62	43	55	43	56
Verticillium sp	-	-	-	-	-	-	-	-	16	9	7	5	21	13

* Fresh fallen leaves
* Feuilles récemment tombées

Table 5 - Percentage frequency of observed fungi in moist chambers (A) and isolated from disinfected-washed fragments (B) from green leaves and leaf litter of *Liquidambar styraciflua*. Values are the average of six replicates. Only those species occurring with a frequency higher than 5% have been listed.

Tableau 5 - Pourcentage de fréquence des champignons observés dans les chambres humides (A) et isolés des fragments désinfectés-lavés (B) des feuilles vertes et de la litière de *Liquidambar styraciflua*. Les valeurs sont la moyenne de 6 répétitions. Seules les espèces ayant une fréquence supérieure [redacted] 5% sont présentées.

DISCUSSION

The importance of using complementary techniques in mycological studies has been pointed out by Dickinson (1971). In spite of the limitations of the two methods employed in this study, they provided enough information to compare the mycoflora between green leaves and leaf litter and to detect changes in the fungal species involved in the decomposition of the three leaf species.

Very few species observed in damp chambers were isolated by the washing and plating technique. This could be due to the difficulty of these fungi to compete with the fast-growing species when plated on synthetic media.

The fungi observed on sterilized surface washed disks may be considered as internal tissue colonizers involved in the depletion of the substrate. The frequent ocurrence of *Trichoderma viride* on plates could be related to the low number of species observed [redacted] the cultural isolations. This fungus covered the whole surface of some plates, preventing the growth of other species.

Examination of green leaves revealed the species capable of surviving on leaf litter. The fungi *Alternaria* spp., *Cladosporium* spp. and *E. purpurascens* were found on green leaves and litter in the early stages of decay. These species are common leaf-inhabitants and have been reported in the phylloplane of [redacted] wide range of plants. Because of their frequency on senescent leaves and relatively undecayed plant debris, these species are considered [redacted] common primary saprophytes (Hudson, 1968).

Pestalotiopsis maculans was one of the few fungi found on green leaves and during all stages of litter decay. This fungus presented a high frequency occurrence on both green leaves and fresh fallen leaves. *Pestalotiopsis* spp. have been reported as early colonizers on the leaf litter of *Nothofagus truncata* (Ruscoe, 1971), on *Quercus phillyraeoides* and *Castanopsis cuspidata* (Tubaki & Yokoyama, 1971). *Pestalotiopsis* spp. are known plant parasites on numerous species of higher plants (Guba, 1961). Its presence, even in low percentages, on well decayed leaves demontrates its ability to survive on dead material.

The litter mycoflora on leaves of the three tree species was characterized by many fungi that appeared sporadically and with low frequency. Only a few species were constant throughout the decomposition process. A similar observation was made by Watson et al. (1974) on loblolly pine and hardwood leaf litter.

According to the Sorensen Index of similarity, the three kinds of leaves shared a high percentage of species. However, the frequency of occurrence of various fungi were different on the three types of leaves. On *Q. germana* and *Q. sartorii*, the dominant species was *B. rhombica*. By contrast, on *L. styraciflua* leaves, *B. rhombica* disappeared rapidly during the early stages of decay. The dominant species on *L. styraciflua* was *C. scoparium*. These results suggest a selective effect of the host leaves on the fungal flora. The chemical composition on leaf tissues may have important effects on fungi development (Swift, 1976).

Although *B. rhombica* was found on green leaves and fresh fallen leaves, this species appeared to prefer senescent and well-decayed leaves. Similar results were obtained by Padney (1990) on guava leaves. On wild plants Kiffer et al. (1981) and Rambelli et al. (1983) reported *B. rhombica* as a dominant fungus on leaf litter of tropical plants.

The presence of *C. scoparium* as the most abundant fungus on *L. styraciflua* leaf litter and the frequent detection of *Verticillium* spp. and *Fusarium* spp. may be related to the more rapid decay of this litter type. The genera *Verticillium* and *Fusarium* include some soft rot species, while *C. scoparium* has been reported [redacted] a phytopathogen causing leaf blight and damping-off on seedlings of ornamental plants (Westcott, 1960) and root decline of *Abies, Acacia* and *Liquidambar* hosts (Farr et al., 1989).

Ch. alabamensis, E. gallesiae, C. assamica, C. kakombensis and *S. procurvata* appeared regularly enough to be considered leaf litter-inhabiting fungi. All these fungi have a tropical and subtropical distribution (Ellis, 1971; Ellis, 1976; Rambelli et al., 1983).

The variation in the frequency of fungal species during the litter decomposition did not appear to be related to climatic conditions. The constant shedding of leaves along the year and the continuous canopy cover of the forest besides an almost constant mean temperature in this forest (Fig. 1), may retard evaporation from the deeper litter layers. Consequently, it is possible that the microclimate created in the leaf litter layer reduce the effect of weather changes on litter mycoflora. Other factors such as antagonism, competition, predation and chemical changes on the substrate must play an important role in determining the changes on the abundance of the fungal species.

Most of the species observed in this study were fungi imperfecti, especially dematiaceous forms. Hering (1965) and Rambelli et al. (1983) have pointed out the presence of dark mycelium species on leaf litter. Rambelli et al. (1983) concluded that a higher frequency of pigmented species exists on leaf litter than in soil. The advantages of fungal pigmented structures on leaves have been discussed by Diem

Primary saprophytes (green ■ fresh fallen leaves)	Secondary saprophytes (leaf litter)
	decomposition progress early middle advanced
	Leaf litter fungi
Alternaria alternata	*Beltrania rhombica*[1]
Alternaria tenuissima	*Codinaea assamica*
Cladosporium cladosporioides	*Cryptophiale kakombensis*
Cladosporium herbarum	*Cylindrocladium scoparium*[2]
Curvularia lunata	*Chalara alabamensis*
Epicoccum purpurascens	*Ellisiopsis gallesiae*
Olpitrichum macrosporum	*Pestalotiopsis maculans*
Pestalotiopsis maculans	*Subulispora procurvata*
Rhinocladiella sp	
Tubakia dryina	
	Soil fungi
	Fusarium spp
	Penicillium spp
	Trichoderma viride
	Mucor hiemalis
	Verticillium sp

Table 6 - General fungal succession pattern on *Quercus germana, Q. sartorii* and *Liquidambar styraciflua* leaves.
[1] Only on *Q. germana* and *Q. sartorii*.[2] Only on *L. styraciflua*.

Tableau 6 - Modèle général de la succession fongique pendant la décomposition des feuilles de *Quercus gremana, Q. sartorii* et *Liquidambar styraciflua*.
[1] Seulement sur *Q. germana* et *Q. sartorii*.[2] Seulement sur *L. styraciflua*.

(1971). The thicker hyphal walls make them more resistant to bacterial lysis and depredation.

On the other hand the fungal potential for leaf component utilization, must influence the occurrence of certain species. White et al. (1948) reported many dark-pigmented fungi able to break down cellulose. Kjoller & Struwe (1980) isolated microfungi on decomposing red alder *(Alnus glutinosa)* leaves and tested their ability to grow on different substrates. They found that the dematiaceous *Phoma* spp. and *Cladosporium* spp. had high potentials for cellulose and starch utilization. These results suggest that the high frequency of dematiaceous species on leaf litter could be related to their ability to decompose leaf litter material. Unfortunately, the physiology of most fungi associated with the leaf litter is unknown.

A scheme of the fungal succession is presented in table 6. In general, the mycoflora succession pattern on the three leaves studied is like that mentioned by Hudson (1968) on deciduous leaves. As most of the leaf litter fungal successions described, Deuteromycetes species were observed since early decomposition stages, in contrast, Zygomycetes species were infrequent and apppeared on late decay stages. This gives support to Webster's observations (1957) that Mucorales play little if any part in the decomposition of plant remains above the soil.

Regarding Basidiomycetes, mycelia with clamp connections were occassionaly observed on damp chambers. The absence of Basidiomycetes in the isolation media may be due to their low capacity to grow on synthetic media.

Fungal species reported on leaf litter from temperate and tropical forests are the same as those observed on cloud forest leaf litter mycoflora on fresh fallen leaves and late decay. Nevertheless throughout the decomposition and on advanced decay stages there is a group of leaf litter-inhabiting fungi characteristic of tropical forests plant remains.

Acknowledgments. - I am grateful to D. Parkinson and S. Visser for helpful comments on the manuscript. I also thank V. J. Sosa for his valuable assistance throughout the study and I. Barois for French translation.

REFERENCES

BARRON G.L., 1968 - *The Genera of Hyphomycetes from Soil.* Baltimore, Williams & Wilkins Co. 364p.

BOCOCK K.L. and GILBERT O.J., 1957 - The disappearance of leaf litter under different woodland conditions. *Plant Soil* 9: 179-185.

BRACHO R. y PUIG H., 1987 - Producción de hojarasca y fenología de ocho especies importantes del strato arbóreo. *In:* H. PUIG & R. BRACHO, *El bosque mesófilo de montaña de Tamaulipas.* Mexico, Pub. 21 Instituto de Ecología, 81-106.

BROWER J.E. and ZAR H.H., 1977 - *Field and Laboratory Methods for General Ecology.* Iowa, W.M.C. Brown, Co. Pub. 194p.

CARMICHAEL J. W., KENDRICK W. B., CONNERS I.L. and SIGLER L., 1980 - *Genera of Hyphomycetes.* Canada, Univ. Alberta Press. 386p.

DICKINSON C.H., 1971 - Cultural studies of leaf saprophytes. *In:* T.F. PREECE & C.H. DICKINSON, *Ecology of leaf surface micro-organisms.* London, Academic Press, 129-137.

DIEM H.G., 1971 - Effect of low humidity on survival of germinated spores commonly found in the phyllosphere. *In:* T.F. PREECE & C.H. DICKINSON, *Ecology of leaf surface micro-organisms.* London, Academic Press, 210-219.

ELLIS M.B., 1971 - *Dematiaceous Hyphomycetes.* Kew, Commonwealth Mycol. Inst. 609p.

ELLIS M.B., 1976 - *More Dematiaceous Hyphomycetes.* Kew, Commonwealth Mycol. Inst. 507p.

FARR F., BILLS G.F., CHAMURIS G. P. and ROSSMAN A.Y., 1989 - *Fungi on Plants and Plant Products in the United States.* Minnesota, APS Press. 1252p.

FRANKLAND J.C., 1966 - Succession of fungi on decaying petioles of *Pteridium aquilinum. J. Ecol.* 54: 41-63.

GLAWE D.A. and CRANE J.L., 1987 - Illinois fungi XIII. *Tubakia dryina. Mycotaxon* 29: 101-112.

GUBA E.F., 1961 - *Monograph of Monochaetia and Pestalotia.* Cambridge, Harvard Univ. Press. 342p.

HARLEY J.L., 1971 - Fungi in Ecosystems. *J. Ecol.* 59: 653-668.

HERING T.F., 1965 - Succession of fungi in the litter of a Lake District oakwood. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 48: 391-408.

HOGG B. M. and H. J. HUDSON, 1966 - Micro-fungi on leaves of *Fagus sylvatica* I. The micro-fungal succession. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 49: 185-204.

HUDSON H.J., 1962 - Succession of micro-fungi on ageing leaves of *Saccharum officinarum. Trans. Brit. Mycol. Soc.* 45: 395-423.

HUDSON H.J., 1968 - The ecology of fungi on plant remains above the soil. *New Phytol.* 67: 837-874.

JENSEN V., 1974 - Decomposition of angiosperm tree leaf litter. *In:* C.H. DICKINSON & G.J.F. PUGH, *Biology of plant litter decomposition.* London, Academic Press, 69-104.

KIFFER E., PUIG H. and G. KILBERTUS G., 1981 - Biodégradation des feuilles d'*Eperia falcata* Aubl. en forêt tropicale humide (Guyane Française). *Rev. Ecol. Biol. Sol.* 18: 135-151.

KJOLLER A. and STRUWE S., 1980 - Microfungi of decomposing red alder leaves and their substrate utilization. *Soil Biol. Biochem.* 12: 425-431.

LANGVARD F., 1980 - A simple and rapid method for qualitative and quantitative study of the fungal flora of leaves. *Canad. J. Microbiol.* 26: 666-670.

MEREDITH D.S., 1962 - Some fungi on decaying banana leaves in Jamaica. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 45: 335-339.

MILLAR C.S., 1974 - Decomposition of coniferous leaf litter. *In:* C.H. DICKINSON & G.J.F. PUGH, *Biology of plant litter decomposition.* London, Academic Press, 105-128.

MORGAN-JONES and INGRAM E. G., 1976 - Notes on Hyphomycetes. XII. A new species of *Chalara. Mycotaxon* 4: 489-492.

NAG RAJ T.R. and KENDRICK B., 1975 - *A Monogragh of Chalara and Allied Genera.* Waterloo, Wilfrid Laurier University Press. 200p.

NAG RAJ T.R., 1985 - Redisposals and redescriptions in the *Monochaetia-Seiridium, Pestalotia-Pestalotiopsis,* complexes. I. The correct name for the type species of *Pestalotiopsis. Mycotaxon* 22: 43-51.

NAWAWI A. and KUTHUBUTHEEN A.J., 1987 - *Triscelosporium verrucosum* gen. et sp nov., a dematiaceous aero-aquatic hyphomycete with tetraradiate conidia. *Mycotaxon* 29: 285-290.

PADNEY R.R., 1990 - Succession of microfungi on leaves of *Psidium guajava* L.. *Bull. Torrey Bot. Club.* 117: 153-162.

PIROZYNSKI K.A., 1963. *Beltrania* and related genera. *Mycol. Pap.* 90: 1-37.

PUIG H. and BRACHO R., 1987 - Climatología. *In:* H. PUIG & R. BRACHO, *El bosque mesófilo de montaña de Tamaulipas.* México, Pub. 21 Instituto de Ecología, 39-54.

PUIG H., BRACHO R. y SOSA V., 1987 - El bosque mesófilo de montaña: composición florística y estructura. *In:* H. PUIG & R. BRACHO, *El bosque mesófilo de montaña de Tamaulipas.* México, Pub. 21 Instituto de Ecología, 55-79.

RAMBELLI A., PERSIANI A.M., MAGGI O., LUNGHINI D., ONOFRI S., RIESS G., DOWGIALLO and PUPPI G., 1983 - Comparative studies on microfungi in tropical Ecosystems. Mycological Studies in South Western Ivory Coast Forest. Roma, MAB-UNESCO, Report No. 1.

RIFAI, M. A., 1969 - A revision of the genus *Trichoderma. Mycol. Pap.* 116: 1-56.

RUSCOE Q. W., 1971 - Mycoflora of living and dead leaves of *Nothofagus truncata. Trans. Brit. Mycol. Soc.* 56: 463-474.

SOSA V.J., 1987 - Generalidades de la región de Gómez Farías. *In:* H. PUIG & R. BRACHO, *El bosque mesófilo de montaña de Tamaulipas.* México, Pub. 21 Instituto de Ecología, 15-28.

SWIFT M.J., 1975 - Species diversity and the structure of microbial communities in terrestrial habitats. *In:* J.M. ANDERSON & A.M. MaCFADYEN, *The role of terrestrial and aquatic organisms in decomposition processes.* London, Blackwell Sci. Publ., 185-222.

TUBAKI K. and YOKOYAMA T., 1971 - The fungal flora developing on sterilized leaves placed in the litter of japanese forests. *In:* T.F. PREECE & C.H. DICKINSON, *Ecology of leaf surface micro-organisms.* London, Academic Press, 457-462.

ULLOA M. and HANLIN R., 1978. *Atlas de Micología básica.* México, Edit. Concepto. 158p.

VISSER S. and PARKINSON D., 1975. Fungal succession on aspen poplar leaf litter. *Canad. J. Bot.* 53: 1640-1651.

WATSON E.S., Mc CLURKIN D.C. and HUNEYCUTT M.B., 1974 - Fungal succession on loblolly pine and upland hardwood foliage and litter in North Mississippi. *Ecology* 55: 1128-1134.

WEBSTER J., 1957 -Succession of fungi on decaying cocksfoot culms II. *J. Ecol.* 45: 1-30.

WESTCOTT C., 1960 - *Plant Disease Handbook.* New York, Van Nostrand Reinhold Company. 825p.

WHITE, W. L., DARBY R. T., STECHART C. M. and SANDERSON K., 1948 - Assay of cellulolytic activity of moulds isolated from fabrics and related items exposed in the tropics. *Mycologia* 40: 43-84.

ZAR J.H., 1974 - *Biostatistical Analysis.* London, Prentice-Hall, Inc. 620p.

SELECTIVE EFFECT OF ORGANOPHOSPHATE INSECTICIDES ON METABOLIC ACTIVITIES AND AFLATOXINS BIOSYNTHESIS BY TWO *ASPERGILLUS* SPP.

H.A.H. HASAN and S.A. OMAR

Botany Department, Faculty of Science, Assiut University, Assiut, Egypt.

ABSTRACT - In liquid cultures treated with three organophosphate insecticides (Dimethoate, Malathion, and Selecron) at rates 10, 50, 100, 250 and 500 mg/L active ingredient, mycelial production by *Aspergillus flavus* IMI 89717 was significantly promoted with most treatments and inhibited only at 500 mg/L level. Mycelial dry weight of *A. parasiticus* var. *globosus* IMI 120920 was significantly delayed by all used doses. Respiration of *A. flavus* was decreased [redacted] the higher rates of Dimethoate and Malathion but the effect of Selecron was unclear. CO_2 production by *A. parasiticus* was promoted in all cases. The pattern for depletion of total fatty acids with Malathion was similar to that for aflatoxins while [redacted] inverse relationship was recorded between fatty acids and aflatoxins biosynthesis with Dimethoate and Selecron by both toxigenic aspergilli. On sorghum treated with the three insecticides, the highest application rate (5000 mg/kg) suppressed the production of aflatoxins B_1, B_2, G_1 and G_2 by the two tested aspergilli.

RÉSUMÉ - En milieu liquide, l'ajout de trois insecticides organophosphorés (Dimethoate, Malathion, Selectron), aux concentrations de 10, 50, 100, 250 et 500 mg/l augmente la croissance mycélienne d'*Aspergillus flavus* IMI 89717 pour la plupart des concentrations et n'inhibe la croissance qu'à partir de 500mg/l. La croissance mycélienne d'*Aspergillus parasiticus* var. *globosus* est par contre inhibée aux doses d'insecticides utilisées. L'activité respiratoire d'*Aspergillus flavus* diminue aux doses élevées de Dimethoate et de Malathion, alors que l'action du Selectron est moins nette. La production de CO_2 par *Aspergillus parasiticus* est stimulée dans tous les cas. En présence de Malathion, les taux d'acides gras et d'aflatoxines des deux espèces étudiées diminuent, contrairement à ce qui a été observé en présence de Dimethoate ou de Selectron, où leurs variations sont inverses. Sur le Sorgho, le traitement par les trois insecticides aux concentrations de 5000 mg/kg inhibe la production d'aflatoxines B_1, B_2, G_1 et G_2 pour les deux *Aspergillus* étudiés.

KEY WORDS : aflatoxins, fatty acids, insecticides, respiration.

INTRODUCTION

In warm and tropical countries, stored grain insects such as *Sitophilus* increase the moisture of the grains and can thus initiate hot spots. Many storage fungi including *Aspergillus* spp. have been isolated from stored grain insects, thus proving that insects act as vectors for the fungi (Wallace, 1973). Aflatoxins [redacted] a group of highly toxic secondary metabolites produced by the fungi, *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus* in

corn, cotton seed, peanuts and other commodities in the field and storage. Aside from their much feared carcinogenic potential, aflatoxins cause serious economic loss to the nation's agriculture every year.

Organophosphate insecticides are one of the most important groups of modern pesticides that are usually used in agricultural practice, to resist the harmful insects that attack crops, due to their high insecticidal activity, the broad spectrum and rapid action on pests, and to their decomposition with formation of products non toxic to human and animals (Gruzdyev et al., 1983).

In past reviews it was found that organophosphate insecticides strongly inhibited aflatoxin production by *Aspergillus* spp. (Rao & Harein, 1972, 1973; Hsieh, 1973; Schroeder et al., 1974; Draughon & Ayres, 1978, 1979, 1981; Draughon et al., 1983). On the other hand, Draughon (1983) found that some organophosphate insecticides such as Dursban and Nellite, increased aflatoxin production by *A. flavus* in liquid medium. Also, she warned that certain insecticides could stimulate growth and aflatoxin production by *Aspergillus* spp. on crops. Also respiration and mycelial growth of fungi was found to be affected by insecticides application (Anderson, 1978).

Our purpose was to determine the effects of three extensively used organophosphate insecticides on growth, respiration and synthesis of fatty acids in liquid medium by toxigenic moulds. Also, their effect on aflatoxins production in liquid medium and on natural substrate (sorghum grains), was investigated.

MATERIALS AND METHODS

Microorganisms:

Aspergillus flavus IMI 89717 and *A. parasiticus* var. *globosus* IMI 120920 were used throughout this study. The two moulds were maintained on potato dextrose agar (PDA) slants.

Medium:

To measure aflatoxin production, fatty acids synthesis, growth and CO_2 evolution, Czapek's Dox medium was used. Aflatoxin production was also carried out on sorghum grains.

Insecticides:

Three organophosphate insecticides were used in this investigation, Dimethoate [0,0-dimethyl s-(2-(methylamino)-2-oxoethyl) phosphorodithioate], Kafr El-Zayat; Malathion [0,0- dimethyl -s -(1,2-dicarbethoxyethyl) phosphorodithioate], El-Naser Chemicals Co. and Selecron [0-(4-bromo-2-chloro-phenyl) 0-ethyl S-n-propyl phosphorothioate], Ciba Geigy.

Procedure:

The Dox medium was dispended in 250 ml Erlenmeyer conical flasks with 50ml in each, flasks were autoclaved at 121°C for 15 min. Insecticides were sterilized through membrane filter and added to cooled autoclaved media to give concentration of 10, 50, 100, 250 and 500 mg/L active ingredient. Flasks used as blanks received sterilized water equivalent to volumes of insecticides used. After gentil shaken, control and treated flasks were inoculated with 1ml of spore suspension of 7 days old agar slant.

Lots of 50g of sorghum grains were sterilized by shaking in 5% NaOCl solution for 5 min and rinsing in three changes of sterile distilled water. Thereafter, the samples were placed in sterile polyethylene bags and thoroughly mixed with different doses of the insecticides. Each bag was inoculated by 1 ml of [redacted] heavy spore suspension. Sterile distilled water was added to raise the moisture content of the grains to 25%. The liquid and sorghum grains cultures were incubated at 28°C for 7 and 14 days, respectively, before measuring fungal activities.

Mycelial growth determination:

Mycelia of 7 days old cultures were harvested by filtration through Whatman filter paper n° 1 under lower pressure vacuum then dried at 80°C till constant dry weight.

Measuring of mycelial respiration:

The modified substrate-induced respiration technique (Cheng & Coleman, 1989) was used for measuring mycelial respiration. Two conical flasks for control and treatments, containing 7 days old cultures, were flushed with continuous CO_2-free air. The CO_2 evolved from the cultures was carried by the air current to the final CO_2 trap (50ml of 0.5 M NaOH). After 10 hours exposure, the final traps were removed and mixed with excess of $BaCl_2$ solution to precipitate carbonate. The NaOH in the final trap is then titrated with 0.25 M HCl using phenolphthalein [redacted] an indicator.

Aflatoxin analysis:

For this purpose cultures (filtrate + mycelium) and sorghum grains cultures of 7 and 14 days old, respectively, were extracted with 100 ml chloroform. The extract was then evaporated till dryness on a rotary evaporator. Aflatoxin residue was dissolved in chloroform and separated by thin-layer chromatography on Silica Gel 60-coated plates, using chloroform-acetone (9:1) as the developing solvent. The spots of aflatoxins B_1, B_2, G_1 and G_2 were removed from the plate, eluted with methanol and estimated spectrophotometrically (Nabney & Nesbitt, 1965). Aflatoxins B_1 and B_2 were estimated together as aflatoxin B, and G_1 and G_2 as aflatoxin G, using extinction coefficients for aflatoxins B_1 and G_1, respectively.

Fatty acids determination:

The total fatty acids were determined by the phosphovanillin method of Zöllner & Kirsch (1962).

RESULTS AND DISCUSSION

Regarding to results presented in table 1, mycelial growth and mycelial respiration of the two tested moulds showed different responses to insecticides application.

Mycelial biomass of *A. flavus* was significantly increased with most doses of Dimethoate, Malathion and Selecron whereas the highest dose (500 mg/L) has inhibitory effect. In case of *A. parasiticus*, the mycelial dry weight was significantly decreased, compared with the control, with all used doses of insecticides and the inhibition was more pronounced in case of Selecron than Dimethoate and Malathion. The selective effect of organophosphate insecticides on growth of fungi was discussed before by some authors. Cowley & Lichtenstein (1970) reported that Phorate at 1 and 2 mg/L stimulated the growth of *A. fumigatus*. Also, Hasan (1988) found that Actellic

organophosphate insecticides	Concn (mg a.i./L)[a]	*A. flavus*		*A. parasitivus*	
		Dry wt	CO_2 evolution	Dry wt	CO_2 evolution
	0	250	48.0	424	24.9
Dimethoate	10	296*	70.4*	318*	33.2
	50	292*	48.0	334*	31.6
	100	278*	30.4*	254*	41.6*
	250	300*	30.4*	280*	41.1*
	500	150*	35.2*	224*	36.4*
Malathion	10	314*	48.0	308*	65.5*
	50	326*	54.6	348*	99.3*
	100	312*	61.2*	286*	53.7*
	250	280*	39.4*	330*	94.5*
	500	242	29.5*	328*	36.6*
Selecron	10	344*	61.2*	266*	75.8*
	50	278*	48.0	266*	166.0*
	100	268*	48.0	244*	161.3*
	250	232	59.3*	216*	55.5*
	500	200*	52.8	172*	50.2*

Table 1: Effect of organophosphate insecticides on mycelial growth (mg/50ml medium) and CO_2 evolution (mg/g dry wt/24h) of *A. flavus* [illegible] 89717 and *A. parasiticus* var. *globosus* IMI 120920.

* Means significant difference compared to the control [illegible] 5% level.

proved to be promotive to the mycelial growth of *Curvularia lunata* at 10 mg/L. Increasing growth of fungi in cultures treated with insecticides was regarded as a result of their ability to degrade insecticides (Anderson & Lichtenstein, 1972). On the other hand, the adverse effect of insecticides on growth of fungi was documented. In this respect, *Cunninghamella echinulata* was completely eliminated by 32.7 mg/L Curacron (Abdel-Kader et al., 1981). Also, Abdel-Kader et al. (1984) studied the effect of incorporation of Phosphamidon into Czapek's liquid media on the growth of fungi. They reported that the three used doses (1,4 and 8 mg/L) inhibited the growth of *Penicillium corylophilum*. Other results came in agreement with our finding. They were obtained by Abdel-Mallek (1984) and Shonquir (1989). El-Abyad et al. (1988) referred to the inhibition of growth of two *Fusarium* wilt fungi due to decrease in sugar uptake.

Organophosphate insecticides	Concn (ppm) a.i.)	*A. flavus*					*A. parasiticus*				
		Total fatty acids (as oleic acid)	Aflatoxins				Total fatty acids (as oleic acid)	Aflatoxins			
			B_1+B_2	inhibition %	G_1+G_2	inhibition %		B_1+B_2	inhibition %	G_1+G_2	inhibition %
	0	21.4	290	0.0	380	0.0	19.6	310	0.0	400	0.0
Dimethoate	10	22.7	295	0.0	390	0.0	20.1	310	0.0	400	0.0
	50	29.8*	315	0.0	422	0.0	20.1	310	0.0	400	0.0
	100	27.2*	350*	0.0	456*	0.0	20.5	280	9.7	360	10.0
	250	28.2*	232*	20.0	360*	5.3	20.9	276*	11.0	320*	20.0
	500	35.8*	87*	70.0	228*	40.0	21.8	186*	40.0	240*	40.0
Malathion	10	19.8	290	0.0	380	0.0	19.7	310	0.0	400	0.0
	50	19.9	280	3.5	360	5.3	19.6	372*	0.0	460	0.0
	100	19.7	270	6.9	340	10.5	19.3	356*	0.0	480*	0.0
	250	17.6*	58*	80.0	76*	80.0	18.9	124*	60.0	166*	48.5
	500	18.5*	15*	94.8	19*	95.0	16.4*	66*	78.7	86*	78.5
Selecron	10	21.7	230*	20.7	370	2.6	29.7*	68*	78.1	80*	80.0
	50	20.3	174*	40.0	230*	39.5	31.3	62*	80.0	80*	80.0
	100	27.5*	116*	60.0	152*	60.0	24.7*	58*	81.3	70*	82.5
	250	33.7*	62*	78.6	148*	61.1	26.6*	42*	86.5	40*	90.0
	500	36.4*	54*	81.4	142*	62.6	32.6*	31*	90.0	34*	91.5

Table 2: Effect of organophosphate insecticides on total fatty acids content (mg/g dry wt) and production of aflatoxins (µg/g dry wt) by *A. flavus* IMI 89717 and *A. parasiticus* var. *globosus* IMI 120920.

* Means significant difference compared to the control at 5% level.

Mycelial respiration of *A. parasiticus* occurs in opposite manner to mycelial dry weight but respiration of *A. flavus* was inhibited with the higher rates of Dimethoate and Malathion whereas slightly influenced by Selecron. Disturbance of respiration under stress conditions appear to be a general phenomenon. However, insecticides seem likely stimulate respiration (Anderson, 1978). Increasing rate of respiration by toxicants was recorded by McCallan et al. (1954). O_2 uptake by *A. fumigatus, Cunninghamella echinulata* and *P. funiculosum* was stimulated by the organophosphate insecticide Dimethoate when applied at rate of 13.5 and 67.5 mg/L (Shonquir, 1989). In recent investigation, Abdel-Basset et al. (1992) reported that respiration of three mesophilic fungi was fluctuated by the insecticide Selecron but they found that the increase in CO_2 evolution was more pronounced. The increase in respiration rate by toxicants may possibly be due to increase in membrane permeability to substrate as indicated by Kurtz et al. (1982). Another explanation for increasing rate of respiration is the stimulation of metabolic activity as well [redacted] uncoupling of oxidative phosphorylation (Anderson, 1978). On the other hand, inhibition of respiration by pesticides application could be due to inhibition of oxidative phosphorylation and ATPase activity as concluded by Tam & Trevors (1981).

The effect of selected organophosphate insecticides on total fatty acids contents and aflatoxins production by the two toxigenic moulds in liquid medium was variable (Table 2). Fatty acids synthesis by the two fungi was delayed with Malathion. Kutzner & Buchenauer (1986) have shown that the Triazole fungicides treatment caused an appreciable reduction in mycelial triglyceride contents of *Fusarium moniliforme*. On the other hand, Dimethoate and Selecron caused an increase in fatty acids content of *A. flavus* and *A. parasiticus*. These results agree with that reported by Detroy & Hesseltine (1969). Also Weete & Wise (1987) found that treatment of *A. ochraceus* with Triazoles caused accumulation of free fatty acids and increased linoleic acid.

Production of aflatoxins B_1, B_2, G_1 and G_2 in liquid medium was inhibited by the three insecticides at 250 and 500 mg/L levels and the inhibition was more pronounced with Selecron followed by Malathion and Dimethoate (Table 2). Toxins production by *A. flavus* was promoted with 100 mg/L Dimethoate. The stimulatory effect on toxins accumulation in case of *A. parasiticus* was confined to 50 and 100 mg/L Malathion. Induction of aflatoxin synthesis has been observed perviously in cultures of *A. flavus* treated by the organophosphate insecticides Dursban and Nellite (Draughon, 1983). On the other hand, the higher concentration (500 mg/L) of Dimethoate significantly inhibited aflatoxins B_1 and B_2 by 70% and G_1 and G_2 by 40% in *A. flavus* and all aflatoxins by 40% in *A. parasiticus*. Also, production of aflatoxins B_1, B_2, G_1 and G_2 in both aspergilli was significantly inhibited at 250 mg/L of Malathion. Increasing the concentration of Malathion to 500 mg/L increased inhibition of aflatoxins production. Also, all aflatoxins were inhibited by all Selecron concentrations, which represents the most effective insecticide. The inhibition of aflatoxins synthesis by organophosphate insecticides was reported before by Draughon & Ayres (1978, 1979, 1981). They found that Naled, Diazinon, Dyfonate and Malathion significantly inhibited aflatoxin production at 100 mg/L. Also, Malathion inhibited production of citrinin and patulin by 96 and 42%, respectively.

The pattern for depletion of total fatty acids with Malathion was similar to that for aflatoxins, but an inverse relationship was recorded with Dimethoate and Selecron in both toxigenic aspergilli. Several authors recorded a relationship between lipid metabolism and aflatoxins biosynthesis. Detroy & Hesseltine (1969) reported an inverse relationship between fatty acids and aflatoxin formation. Shih & Marth (1974), on the other hand, found that the pattern for formation and depletion of total lipids was simi-

organoph-osphate insecticides	concn (mg a.i./kg)	*A. flavus*				*A. parasiticus*			
		afla-toxin B_1+B_2	Inhib-ition %	Afla-toxin G_1+G_2	Inhib-ition %	Afla-toxin B_1+B_2	Inhib-ition %	Afla-toxin G_1+G_2	Inhib-ition %
	[illegible]	430	-	230	-	680	-	350	-
Dimethoate	1000	810*	-	650*	-	750*	-	490*	-
	5000	220*	48.8	115*	50.0	205*	69.9	58*	83.4
Malathion	1000	420	2.3	320*	-	540	20.6	230*	34.3
	5000	280*	34.9	95*	58.7	270*	60.3	110*	68.6
Selecron	1000	640*	-	420*	-	340*	50.0	170*	51.4
	5000	330*	23.3	155*	32.6	130*	80.9	90*	74.3

Table 3: Effect of organophosphate insecticides on aflatoxin production (µg/kg grains) by *A. flavus* IMI 89717 and *A. parasiticus* var. *globosus* IMI 120920 on sorghum grains.

* Means significant difference compared to the control at 5% level. a.i. = active ingredient insecticide.

lar to that for aflatoxins, whereas acetate was the common precursor for both aflatoxins and lipid synthesis. Also, Rao & Harein (1973) explained the inhibition of aflatoxin biosynthesis due to interference with the acetate-malonate pathway which seems likely to be ▪ common route in the biosynthesis of secondary metabolites of fungi.

Influence of insecticides on aflatoxin production by the the toxigenic aspergilli was also carried out on sorghum grains at 1000 and 5000 mg active ingredient /kg (table 3). The low dose of application induced promotive effect on the synthesis of aflatoxin especially by *A. flavus*. Stimulation of aflatoxin formation was previously recorded when some pesticides were used for prevention of these toxins (Draughon, 1983; Badii & Moss, 1988; Hasan, 1991). However, the high application rate (5000 mg/kg) inhibited aflatoxin B_1 and B_2 by 23.3-48.8% and G_1 and G_2 by 32.6-58.7% in *A. flavus*. Also inhibited aflatoxin B_1 and B_2 by 60.3-80.9% and G_1 and G_2 by 68.6-83.4% in *A. parasiticus*. In this respect Draughon et al. (1983) found that Naled (organophosphate) at 100 ppm inhibited aflatoxin production in culture medium, but did not affectively reduce aflatoxin production when applied to corn. However Rao & Harein (1972, 1973) and Shroeder et al. (1974) reported that Dichlorvos (organophosphate) at 20 ppm inhibited aflatoxin production in rice, corn, wheat and peanuts. Further work is needed to determine the activity of modern pesticides against different mycotoxin production in foods, feeds or other materials.

CONCLUSION

It is worth mentioning that the organophosphate insecticides promotive the synthesis of aflatoxin by *A. flavus* or/and *A. parasiticus* at 100 mg/L in liquid medium and 1000 mg/kg on sorghum grains. However, they restricted toxin production at 250 and 500 mg/L in liquid medium and 5000 mg/kg on sorghum grains. Selecron had most pronounced effect than Dimethoate and Malathion. Our finding is helpful for prevention purpose of seed stocks for contamination by aflatoxigenic moulds if the insecticides are used in sufficient rates.

REFERENCES

ABDEL-BASSET R., MOHARRAM A.M. and OMAR S.A., 1992 - Effect of Selecron on cellulase production and respiration of three mesophilic fungi. *Bull. Fac. Sci., Assiut Univ.* 21: 145-153.

ABDEL-KADER M.I.A., ABDEL-FATTAH H.H. and HAMIDA S., 1981 - Antifungal effects of Bavistin, Cotoran and Curacron when incorporated with agar or liquid medium. *Pak. J. Sci. Res.* 33: 1-4.

ABDEL-KADER M.I.A., MOUBASHER A.H. and ABDEL-MALLEK A.Y., 1984 - Selective effect of the systematic insecticide Phosphamidon on soil, root-surface and leaf-surface fungi. *Mycologia* 84: 151-158.

ABDEL-MALLEK A.Y., 1984 - Effect of some pesticides on cellulose decomposing fungi in Egyptian soil. Ph. D. Thesis, Bot. Dept., Fac. Sci. Assiut Univ., Egypt.

ANDERSON J.R., 1978 - Pesticide effects on non-target soil microorganisms. *In:* I.R. HILL & S.J.L. WRIGHT, *Pesticide Microbiology*. London, Academic Press, 313-353.

ANDERSON J.P.E. and LICHTENSTEIN E.P., 1972 - Effects of various soil fungi and insecticides on the capacity of *Mucor alternans* to degrade DDT. *Canad. J. Microbiol.* 18: 553-560.

BADII F. and MOSS M.O., 1988 - The effect of the fungicides Tridemorph, Fenpropimorph and Fenarimol on growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus* Speare. *Letters in Applied Microb.* 7: 37-39.

CHENG W. and COLEMAN D.C., 1989 - A simple method for measuring CO_2 in a continuous air-flow system: Modification to substrate - induced respiration technique. *Soil Biol. Biochem.* 21: 385-388.

COWLEY G.T. and LICHTENSTEIN E.P., 1970 - Growth inhibition of soil fungi by insecticides and annulment of inhibition by yeast extract or nitrogenous nutrients. *J. Gen. Microbiol.* 62: 27-34.

DETROY R.W. and HESSELTINE C.W., 1969 - Net synthesis of ^{14}C-labeled lipids and aflatoxins in resting cells of *Aspergillus parasiticus*. *Dev. Ind. Microbiol.* 10: 127-133.

DRAUGHON F.A., 1983 - Control or suppression of aflatoxin production with pesticides. *South Coop. Ser. Bull.* 279: 81-86.

DRAUGHON F.A. and AYRES J.C., 1978 - Effect of selected pesticides on growth and citrinin production by *Penicillium citrinum*. *J. Food Sci.* 43: 576-578.

DRAUGHON F.A. and AYRES J.C., 1979 - Insecticide inhibition of growth and patulin protection by *Penicillium urticae*. *J. Food Sci.* 43: 1232-1234.

DRAUGHON F.A. and AYRES J.C., 1981 - Inhibition of aflatoxin production by selected insecticides. *Appl. Environ. Microbiol.* 41: 972-976.

DRAUGHON F.A., ELAHI M.E. and WEST D.R., 1983 - Insecticide inhibition of aflatoxin production in corn. *J. Agric. Food Chem.* 31: 692-695.

EL-ABYAD M.S., ATTABY H. and ABOU-AISHA K.M., 1988 - Effect of the herbicide Prometryn on metabolic activities of two *Fusarium* Wilt fungi. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 90: 351-358.

GRUZDYEV G.S., ZINCHENKO V.A., KALININ V.A. and STOVTSOV R.I., 1983 - Means for controlling plant pests. Organophosphorus compounds. *In:* GRUZDYEV G.S. Russian, *Chemical Protection of Plants.* 169-227.

HASAN H.A.H., 1988 - Selective effect of some pesticides [redacted] mycoflora and mycotoxins production in corn grains and sunflower seeds. M. Sc. Thesis, Bot. Dep. Fac. Sci. Assiut Univ., Egypt.

HASAN H.A.H., 1991 - Studies on mycotoxins and some metabolic activities of seeds and seedborne fungi treated with Benzimidazole fungicides. Ph. D. Thesis, Bot. Dep., Fac. Sci., Assiut Univ., Egypt.

HSIEH D.P.H., 1973 - Inhibition of aflatoxin biosynthesis by Dichlorvos. *J. Agric. Food Chem.* 21: 468-470.

KURTZ M.E., WAYNE COLE A. and SALIN M.L., 1982 - Some metabolic response of *Rhizoctonia solani* to Naproamide. *Weed Science* 30: 491-494.

KUTZNER B. and BUCHENAUER H., 1986 - Effect of various triazole fungicides on growth and lipid metabolism of *Fusarium moniliforme* as well as on gibberellin contents in culture filtrates of the fungus. Z. *Pflkrankh. Pflschulz* 93: 567-607.

McCALLAN S.E.A., MILLER L.P. and WEED R.M., 1954 - Comparative effect of fungicides on oxygen uptake and germination of spores. Contribution from Boyce Thompson Institute 18: 39-68.

NABNEY J. and NESBITT B.F., 1965 - A spectrophotometric method for determining the aflatoxins. *Analyst* 90: 155-160.

RAO H.R.G. and HAREIN P.K., 1972 - Dichlorvos [redacted] [redacted] inhibitor of aflatoxin production on wheat, corn, rice and peanuts. *J. Econ. Entomol.* 65: 988-990.

RAO H.R.G. and HAREIN P.K.,, 1973 - Inhibition of aflatoxin and zearalenone biosynthesis with Dichlorvos. *Bull. Environ. contam. Toxicol.* 10: 112-115.

SCHROEDER H.W., COLE R.J., GRINGSBY R.D. and HEIN H. Jr., 1974 - Inhibition of aflatoxin production and tentative identification of an aflatoxin intermediate "Versiconal acetate" from treatment with Dichlorvos. *Appl. Microbiol.* 27: 394-399.

SHIH C.N. and MARTH E.H., 1974 - Aflatoxin formation, lipid synthesis, and glucose metabolism by *Aspergillus parasiticus* during incubation with and without agitation. *Biochimica et Biophysica Acta,* 338: 286-296.

SHONQUIR A.M.A., 1989 - Selective effects of three pesticides on soil mycoflora, respiration and decomposition of some organic matters. M. Sc. Thesis, Bot. Dep., Fac. Sci., Assiut University, Egypt.

TAM T.Y. and TREVORS J.T., 1981 - Toxicity of Pentachlorophenol to *Azotobacter vinelandii. Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 27: 230-234.

WALLACE H.A.H., 1973 - Fungi and other organisms associated with stored grain. *In:* SINHA R.N. and MUIR W.E., *Grain storage: Part of a System.* Westport, Connecticut. pp. 71-98.

WEETE J.D. and WISE M.L., 1987 - Effect of triazoles on fungi. V-Response by a naturally tolerant species, *Mucor rouxii. Exp. Mycol.* 11: 214-222.

ZÖLLNER N. and KIRSCH K., 1962 - Uber die quantitative Bestimmung von Lipoiden (Mikromethods) mittels der vielen naturlichen Lipoiden (allen bekannten plasma-Lipoiden) gemeinsamen Sulphophosphovanillin-Reaktion. *Z. Gesamte Exp. Med.* 135: 545-561.

CONTRIBUTION A LA CONNAISSANCE DES *PHANEROCHAETOIDEAE* DE FRANCE (BASIDIOMYCOTINA)

Jacques BOIDIN*, Paule LANQUETIN** et Gérard GILLES***

* 17 rue Duguesclin, 69006 Lyon.
** Laboratoire de Mycologie, Université Claude Bernard,
43 Bd du 11 novembre 1918, 69622 Villeurbanne Cédex.
*** 109 rue des Rosiers, 40400 Tartas.

RÉSUMÉ - Sont décrits *Phanerochaete binucleospordida* n. sp., proche de *Ph. sordida*, mais aux spores binucléées et au basidiome devenant orangé en herbier, *Ph. tamariciphila* n. sp., proche de *Ph. jose-ferreirae*, mais cystidié et connu seulement sur *Tamarix* spp., et *Scopuloides leprosa* (Bourd. & Galz.) nov. comb. Caractères culturaux des 2 derniers.

ABSTRACT - Here we have described *Phanerochaete binucleospordida* n. sp., close to *Ph. sordida* but with binucleated spores and with a basidioma becoming orange in herbarium, *Ph. tamariciphila* n. sp., close to *Ph. jose-ferreirae* but cystidiated, and *Scopuloides leprosa* (Bourd. & Galz.) nov. comb., a species with a holocoenocytic but bipolar behaviour.

Cette mise au point porte sur 3 espèces couramment récoltées en France, mais qui ne peuvent être reconnues dans les travaux traitant du genre *Phanerochaete* Karst. (Eriksson et al., 1978; Burdsall, 1985) et des genres voisins: *Scopuloides* (Massee) v. Höhn. & Litsch. et *Phlebiopsis* Jülich, que Burdsall considère comme des sous-genres de *Phanerochaete*.

I - *PHANEROCHAETE BINUCLEOSPORDIDA* nov. sp.

Jacens, tenuis, adhaerens e cinerascenti alba, in sicco autem ± aurantiaco transiens, margine nulla vel paulo evoluta, pruinosa. Subiculum hyalinum ex hyphis erectis, laxis, x 5-8-(11) µm, pariete crasso, efibulatis. Hyphae superae resinoideis depositis vestitae. Hymenium densum, in sicco aurantiacum, hyphis regularibus, maxime ramosae, efibulatis. Cystidia 60-100 x 6,5-9 µm, subcylindrica, obtusa, pariete incrassato praeter summum, resinoideis depositis vestita. Basidia claviformia, 25-32 x 5-6,5 µm. Sporae cylindricae minime depressae, 5,5-7,5 x 2,5-3,5 µm, binucleatae, leves, haud amyloideae. Holotypus LY 11985.

Le nom choisi est une contraction de *binucleospora-sordida*.

Etalé, membraneux subcéracé, assez mince, blanc sale (Munsell 2,5 Y 8/2), grisâtre (5 Y 8/2, 8/3), crème alutacé (2,5 Y 8/3) à chamois clair (8/4); marge atténuée, étroite, poudreuse. En herbier, membranule lisse saumon jaunâtre (7,5 YR 8/6 ou salmon buff Ridgway, 8/8 ou 7/6 et même fauve 7/10) à saumon (5 YR 6/6) ou

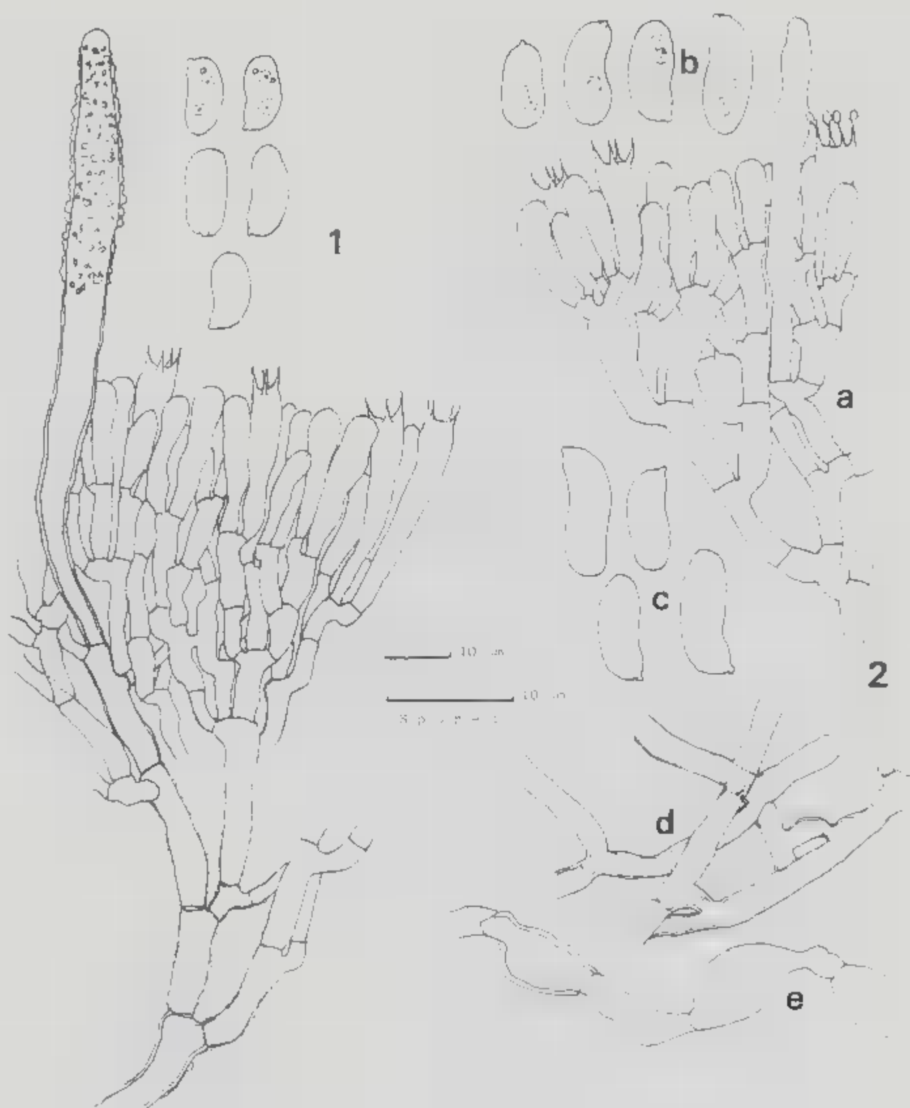


Planche I - 1: *Phanerochaete binucleospordida*. LY 11.985, holotype (Rouge Congo). 2: *Phanerochaete tamariciphila*: a, LY 15329, holotype; b, spores de 11.035; c, de 14928; d, hyphes basales de 10.699, (Phloxine/KOH); e, hyphes vésiculeuses en culture (LY 13816).

abricot (7/8), parfois un peu fendillée, avec bordure étroite, amincie, plus pâle ou un peu plus large et poudreuse.

Coupe haute de 130-250-(300) µm montrant un contexte hyalin et un hyménium jaune orangé. Contexte assez lâche, hyalin, fait d'hyphes dirigées en tous sens, distinctes, x 5-8-(11) µm, à boucles très rares et paroi parfois mince, plus souvent ferme à nettement épaissie (x 1-1,2 µm dans le Congo ammoniacal, mais pouvant atteindre 2 et même 3 µm dans KOH); leurs articles sont plurinucléés. Sous-hyménium dense, aux hyphes x 3-5 µm, à paroi ferme, souvent porteuses de dépôts résinoïdes peu à peu dissous dans les milieux basiques; leurs articles sont binucléés. Cystides nombreuses, 60-80-100-(130) x 6,5-9 µm, un peu plus larges à mi-hauteur, à paroi épaissie (1-1,2 µm) sauf vers le sommet obtus; elles peuvent émerger de 50 µm et sont couvertes de dépôts résinoïdes non cristallisés. Basides claviformes, 25-32 x 5-6,5 µm à 4 stérigmates, à base étroite, x 3-3,2 µm, sans boucle. Spores cylindriques de face, faiblement déprimées de profil, 5,5-7,5 ■ 2,5-3,5-(3,8) µm, lisses non amyloïdes, binucléées; le rapport longueur/épaisseur est de l'ordre de 2 à 2,2.

Récoltes: LY 11.985, sur *Fagus silvatica,* bois de Sansanet, altitude 1350m (Pyrénées atlantiques), 20 juillet 1986, G.G.580, HOLOTYPE; 11.981, 11.983 et 11986, même support et lieu; 10928, sur *Castanea,* Carcen-Ponson (Landes), 16 février 1985, G.G.442; 10943, sur *Platanus acerifolia,* id., 22 février 1985, G.G.450; 10953, sur *Quercus pedunculata,* Pontonx-sur-Adour (Landes) 1er mars 1985, G.G.461; 10961, sur *Salix atrocinerea,* Lesgor (Landes), 3 mars 1985, G.G.467; 11880, sur *Quercus pedunculata,* Carcen-Ponson (Landes) 4 mars 1986; 12.042, sur *Salix atrocinerea,* Pontonx-sur-Adour (Landes), 6 septembre 1986; 12094, sur *Salix,* Oloron-Ste-Marie (Pyrénées atlantiques), 5 oct. 1986, G.G. 645. A ces récoltes sur feuillus, on peut sans doute ajouter quelques récoltes sur conifères, à la couleur saumonée moins intense: LY 1577, sur *Abies alba,* Tarare (Rhône), 6 juin 1954; 10161, sur conifère, Doucy (Savoie), 22 août 1983; 10.180, sur *Picea abies,* La Jairaz, St. Bon (Savoie), 24 août 1983.

La marge brève et peu différenciée, non fibrilleuse et toujours sans cordonnet, et les hyphes du subiculum subarticulées, à paroi épaisse, mènent dans les clés de diverses flores à *Ph. sordida*; mais nos récoltes diffèrent par leurs spores binucléées, et la franche couleur saumonnée ou orangée prise par les basidiomes en herbier, couleur vraisemblablement dûe à l'oxydation des dépôts résinoïdes du sous-hyménium et de l'hyménium. Nous n'avons pas remarqué de basidiomes orangés en herbier parmi les vrais *Ph. sordida* à spores uninucléées. Par contre, cette couleur orangée est signalée par Bourdot & Galzin (1928), Eriksson et al. (1978) pour des récoltes de *P. velutina,* et par ces derniers pour *Ph. laevis. Ph. velutina* a des cystides plus fortes, x 10-15 µm, lourdement incrustées, visibles sous la loupe, d'où l'aspect velouté des hyphes inférieures à paroi peu épaisse, plus larges, jusqu'à 10 µm, souvent engaînées de cristaux; de plus la couleur du basidiome en herbier est plutôt alutacée (10 YR 84 à Isabelle (7,5 YR 7/6) que franchement orangée. La belle couleur orangée peut, par contre, se trouver chez *Phanerochaete laevis,* mais celui-ci a une marge développée, fibrilleuse ou parfois rhizomorphique, des cystides plus grêles, un contexte développé d'hyphes horizontales serrées, à paroi mince ou submince, des spores uninucléées.

Les spores binucléées ne sont pas exceptionnelles dans le genre *Phanerochaete* sensu stricto, quand les spores sont relativement larges: cas de *Ph. martelliana (= macrospora), tuberculata,* ou longues: *Ph. tamariciphila* (voir ci-après); c'est aussi le cas de *Ph. crassa* (Lév.) Burds. (ancien *Lopharia*) et des *Phlebiopsis gigantea* et *roumeguerei* aux spores cependant petites.

II - *PHANEROCHAETE TAMARICIPHILA* nov. sp.

= *Peniophora cremea* (Bres.) Sacc. & Syd. var. *tamaricis* Bourd. & Galz., Hymén. France 304, 1928 (vu type in PC, sur *Tamarix gallica*, plage d'Hyères (Var), leg. A. de Crozals n°65, 29-01-1926, herb. Bourdot 40.330)

Jacens, tenuis, levis, cinerascens deinde gilva vel argillacea; in sicco adhaerens, gilva ad salmoneam, margine angusta, attenuata, pallidiore. Subiculum ex hyphis laxis, pariete firmo, efibulatis. Subhymenium densum. Leptocystidia subcylindrica, 45-(75) x 4-(7) µm, paulum emergentia, pariete tenui, parvis resinoideisque depositis vestita. Basidia anguste claviformia, 22-28-(34) x 5,5-6,5 µm, 4-sterigmatibus. Sporae subcylindricae vel suballantoideae, 6,5-11,5 x 2,8-4 µm interdum paulo latiores in dimidio superiore, pariete tenui, levi, haud amyloideo, binucleatae. In Tamarice sp. in atlanticis et mediterraneis littoribus. Holotypus LY 15329.

Etalé, mince, adhérent, poruleux puis continu, membraneux fragile, blanc pur, puis subcéracé tendre, grisâtre (5 Y 8,5/2) ou plus jaunâtre (8/3), beige (10 YR 7/3 et même 6/3) ou plus rosé (5 YR 7/3) ou, parfois, argillacé (2,5 Y 7/4). En herbier, étalé adhérent, membraneux lisse sur bois écorcé, beige (10 YR 7,5/3), plus rosâtre (7,5 YR 8,5/4 à 7/4), parfois isabelle (7,5 YR 7/5) ou même saumon (5 YR 7/6 à 5 YR 6,5/8); marge étroite, poruleuse, plus pâle; au centre l'hyménium est souvent craquelé ou morcelé laissant voir le subiculum pâle.

Coupe haute de 150-200 µm, mais elle atteint parfois 450 µm d'épaisseur lorsqu'elle montre 2 ou parfois 3 étages hyméniens successifs séparés chacun par une zone lâche. Contexte lâche: sur quelques hyphes horizontales se dressent des hyphes distinctes, lâchement emmêlées, régulières, x 3-5-(7) µm, ramifiées à angle droit ou très ouvert, sans aucune boucle; la paroi est un peu ferme, environ 0,5 µm, mais peut atteindre 0,8-(1) µm sur les premières hyphes accolées au support. Sous-hyménium devenant très dense, fait d'hyphes à paroi mince, souvent ramifiées qui peuvent être piquetées de petits dépôts résinoïdes. Hyménium haut de 70-80 µm, dense, parfois jaune dans l'eau; il est fait de basides étroitement claviformes, 22-28-(34) x 5,5-6,5 µm à 4 stérigmates. Cystides espacées, peu différenciées, subcylindriques, 45-55-(75) x 4-6,5-(7) µm, à paroi mince, nues ou avec léger dépôt résinoïde jaunâtre vite dissous dans KOH, ou parfois quelques petites plaques cristallines; elles émergent de 15-30 µm. Spores cylindriques de face, un peu déprimées de profil à suballantoïdes, à sommet parfois un peu plus large, (6,5)-7-10-(11,5) x 2,8-4 µm, lisses, non amyloïdes ni cyanophiles, binucléées. ($\bar{x}$ = 7,10 à 8,75 x 3,17 à 3,56 µm).

Récoltes: toutes sur *Tamarix* spp. en bord de mer, sur branches basses mortes [redacted] place ou sur branches au sol, plus étendu sur bois écorcé; LY 15329 HOLOTYPE, et 15330, Anglet (Pyrénées atlantiques), 28 octobre 1992; 6982 et 6985, St. Brévin-l'Océan (Loire atlantique), 4 août 1972; 6988, id., 7 août 1972; 7005 et 7009, id., 22 août 1972; 10698, 10699, et 10701, entre Fréjus et St. Aygulf (Var), 15 novembre 1984; 10721 et 10724, id., 17 novembre 1984; 11.035, plage de Lagénèse, Carnac (Morbihan), 30 juillet 1985; 11.773, Bouin (Vendée), 9 octobre 1985; 13.813, Loctudy (Finistère), 16 août 1989; 13.816 et 13.817, Larvor plage (Finistère), 19 août 1989; 13.820, 13.821 et 13.821bis, id., 22 août 1989; 14928, Plage d'Agosta (Corse du Sud), 26 octobre 1991; 14.946, 14949 et 14970, id., 28 octobre 1991; 15.002 et 15005, Plage de Marina Viva, Porticcio (Corse du Sud), 2 novembre 1991; 15348 et 15349, La Barre, Anglet (Pyrénées atlantiques), 1er novembre 1992.

H.H. Burdsall (1985) dans sa monographie internationale du genre *Phanerochaete*, synonymise le *Peniophore cremea* var. *tamaricis* Bourd. & Galz. 1928

avec le *Ph. jose-ferreirae* (Reid) Reid décrit du Portugal sur support non précisé. Placé d'abord dans le genre *Corticium* (Reid, 1965) il est dit par tous ceux qui l'ont décrit ultérieurement "sans cystides": voir par ex. Eriksson, Hjortstam & Ryvarden 1981, p. 1077 et fig. 550, Burdsall 1985, p. 88 et fig. 26 qui le place pour cela dans le sous-genre *Phanericium* Parm., Blanco & al. (1989), ou encore Parmasto (1967) pour *Phanerochaete pallida* considéré comme synonyme. Bourdot et Galzin, par contre, écrivent: "cystides très rares, 45x6 µm, ordinairement peu différenciées". C'est ce que nous avons observé aisément sur toutes nos récoltes faites sur tamaris. Notre champignon des tamaris diffère donc de *Ph. jose-ferreirae* essentiellement par ses petites cystides, car structure, couleurs, forme et taille des spores correspondent bien; on aimerait savoir si les spores de *Ph. jose-ferreirae* sont, elles aussi, binucléées. Nous ne savons pas, par contre, s'ils diffèrent par leur écologie, car le support du type portugais n'est pas indiqué; les autres récoltes connues ont été faites sur *Olea europea, Juglans manshurica, Quercus ilex, Alnus, Betula, Salix, Arbutus unedo,...* Celles de *Ph. tamariciphila* ont toutes été faites sur des tamaris en bordure de mer que ce soit en Corse, dans le Var, les Pyrénées atlantiques, la Vendée, le Morbihan ou le Finistère. Si les cystides sont évidentes lors des études du matériel frais, elles sont moins aisément détectées sur spécimens d'herbier; nous les avons cependant très bien vues sur le *Peniophora cremea* var. *tamaricis* de l'herbier Bourdot (in PC), mais nous n'avons pu en voir sur le type, plus récent, du *Corticium jose-ferreirae* (in K).

C'est pour ne pas limiter au petit et unique spécimen de l'herbier Bourdot, riche en spores étrangères, le type de ce que nous considérons comme une espèce, que nous proposons le nouveau nom de *tamariciphila*; cette espèce sera ainsi représentée par un holotype et les nombreux paratypes signalés plus haut. La parenté du *Ph. jose-ferreirae* acystidié est plus étroite avec *Ph. tamariciphila* qu'avec les autres *Ph.* subgen. *Phanericium*, ce qui nous fait douter du bien fondé de ce sous-genre.

Une autre espèce aux spores suballantoïdes d'assez grande taille est *Ph. cacaina* (Bourd. & Galz.) Burds. & Gilberts. récoltée uniquement sur conifères en France et en Arizona; cette espèce possède des cystides plus fortes et des hyphes inférieures à paroi épaissie; selon Bourdot & Galzin ses spores peuvent atteindre 14 x 5 µm, et le basidiome est brun chocolat.

Si la plupart des *Phanerochaete* montrent sur leurs hyphes les plus larges quelques boucles parfois opposées ou même verticillées, la littérature ne signale aucune boucle chez *Ph. jose-ferreirae,* ni chez *Ph. cacaina; Ph. tamariciphila* n'en montre pas non plus, ce qui est confirmé par l'étude des cultures (voir ci-après). Toutefois, selon Nakasone (1990), les cultures du *Ph. jose-ferreirae* américain montrent de "rare single clamps".

Caractères culturaux de *Phanerohaete tamariciphila*:

Monospermes: hyphes sans boucles aux articles à (2)-3 à 8 noyaux comme le polysperme; l'espèce est donc présumé homothalle".

Polyspermes (LY 13816, 14928, 15002):

Croissance: moyenne, boîtes couvertes entre 3 et 4 semaines.

Aspect: marge régulière; à 6 semaines le mycélium aérien est pratiquement nul, la surface est mate, la culture un peu opaque et hyaline; toutefois certaines cultures montrent une bande blanche plus dense ou une zone âgée testacé pâle (5 YR 6/6) et une bouture rouge brique (2,5 YR 5/6) (cas de 14928 et 15002). A 4 mois, ces cultures sont acajou (10 R 4/6, 4/8) en totalité, ou seulement sur la moitié âgée.

Microscopie:

Mycélium superficiel: hyphes irrégulières, x (1,5)-2-4,5-(6) µm sans boucles, à paroi mince ou localement irrégulièrement épaissie; elles présentent de nombreux élargissements, x 6-8 µm, des vésicules chlamydosporoïdes x 10-15 µm à paroi mince, mais parfois épaisse de 0,5-1,5 µm; elles sont particulièrement nombreuses chez 13816 où elles atteignent 20 µm.

Mycélium submergé: identique mais sans grosses vésicules.

Cytologie: hyphes sans boucles, aux articles plurinucléés à (2)-4 à 8 noyaux; des séries d'articles à (2)-4-5 ou 6 noyaux.

Oxydases:	ac. gallique: -, 0	gaïacol: -, 0
	p-crésol: -	tyrosine: -, tr.

CODE (selon Nobles (1965) complété par Nakasone (1990)): 1-6-26-(32)-(34)-36-40-44-54-(57)-66 faible.

Si la plupart des *Phanerochaete* cultivés ont montré des boucles parfois opposées ou verticillées sur leurs hyphes les plus larges, et des articles terminaux riches en noyaux, nous ne connaissons pas, malheureusement, le comportement nucléaire des quelques espèces totalement sans boucles en culture signalées par K.K. Nakasone (1990): *Ph. allantospora, chrysosporium* et *magnoliae,* et ne pouvons savoir si le très petit nombre de noyaux des articles mycéliens de notre *Ph. tamariciphila* représente un caractère original et atypique dans ce genre.

III - *SCOPULOIDES LEPROSA* (Bourd. & Galz.) nov. comb.

Peniophora leprosa Bourd. & Galz., Hymén. France, 312, 1928. (vu type in PC).
Phanerochaete leprosa (Bourd. & Galz.) Jülich, Persoonia 10: 334, 1979.
Peniophora radicata (P. Henn.) v. Höhn. & Litsch. subsp. *leprosa* Bourd. & Galz. Bull. Soc. Mycol. France, 27: 394, 1912. (1913)

Etalé, membranuleux subcéracé tendre, facilement détachable sous l'aiguille, jaunâtre, alutacé (10 YR 8/3 à 8/6), chamois (7/6), plus grisâtre si imbu (7/2) et même parfois bistre pâle (7,5 YR 5/2), à surface souvent irrégulière, granuleuse sous la loupe et nettement sétuleuse; marge brusque et concolore, ou amincie et plus pâle, parfois fibrilleuse ou même avec jeunes cordonnets ramifiés. En lumière réfléchie au grossissement x 100, on aperçoit de nombreuses cystides ruguleuses, parfois fasciculées, et d'autres, espacées, souvent situées au sommet des légers reliefs, porteuses d'un globule brillant.

En herbier, adhérent, à surface souvent bosselée, parfois un peu subodontioïde, alutacé pâle (10 YR 8/3, 8/4) à beige chamois rosé (9 YR 7/4) souvent fendillée, parfois profondément crevassée; il est alors fragile sous le rasoir, facilement pulvérulent; marge hérissée ou hirsute sous la loupe; elle peut montrer de longs cordons blancs ou alutacé pâle, épais de 250-500 µm; assez souvent absents de la marge, ces cordonnets sont visibles dans le bois ou à proximité du basidiome.

Coupe haute de 100-300 µm mais pouvant atteindre 1mm. A la marge on ne voit que des hyphes incrustées, x 4-6 µm, à aspect cystidiforme, souvent fourchues, sans contexte; les hyphes génératrices, à cloisons simples, x 3-5-(9) µm, à paroi mince ne sont visibles que dans le bois. Au centre on distingue parfois un très faible contexte horizontal, 20 µm p. ex., fait d'hyphes comprimées ou collapsées; souvent, tout apparaît vertical dès la base; c'est un hyménium crassescent fait d'hyphes étroites, x 2-3 µm, sans boucles, serrées et peu distinctes; s'y mêlent d'innombrables lamprocystides

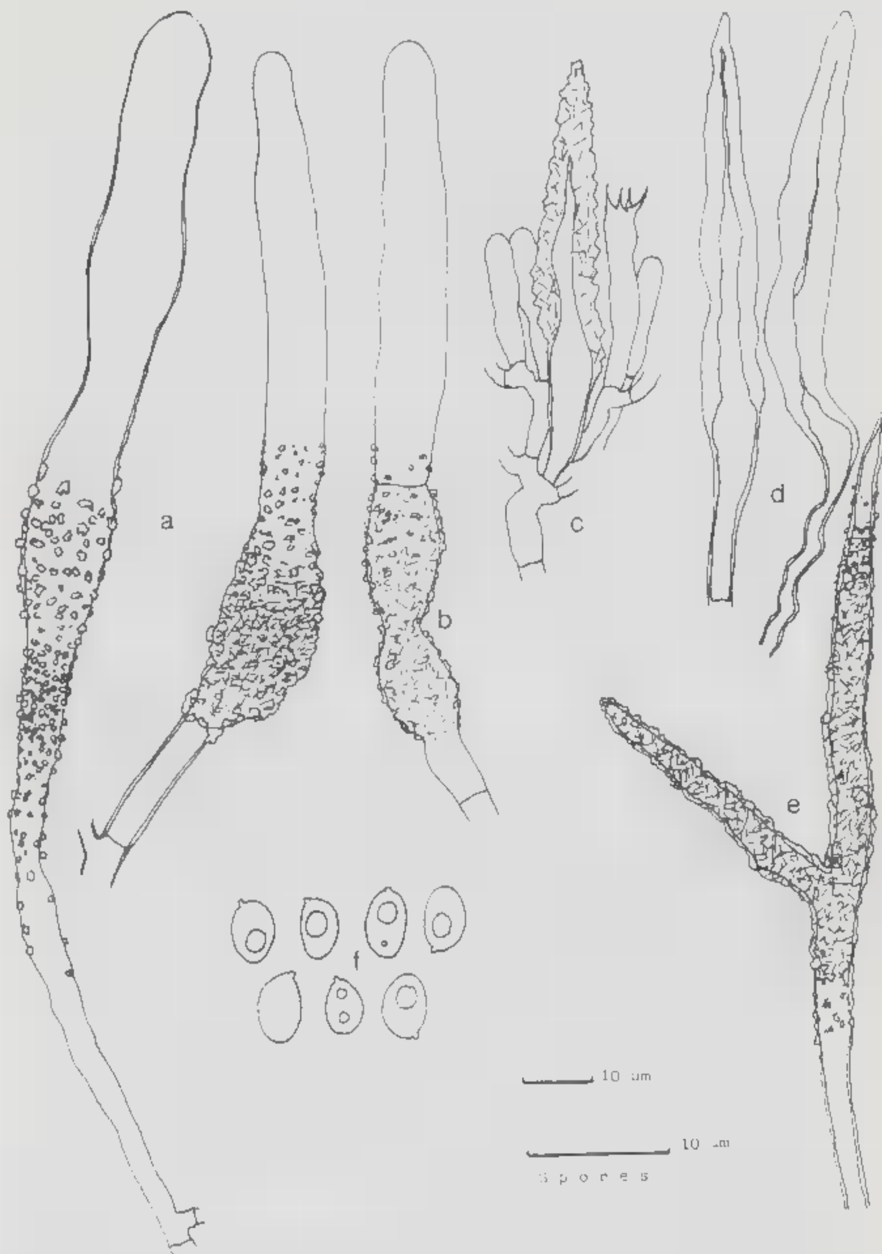


Planche II - *Scopuloides leprosa* (Bourd. & Galz.) Boid. , Lanq. & Gilles: Quelques cystides obtuses à partie émergente sans cristaux: a-LY 14.599, b, 11.907. Fragment d'hyménium avec cystide fusiforme banale (c), et deux cystides débarrassées de leurs cristaux (14.599). Une hyphe cystidiforme fourchue près de la marge (e, 11907). Et f, spores de 13.685.

fusiformes à paroi épaisse, très incrustées, 50-100 x (5)-8-14 µm vers la base, puis progressivement rétrécies, subaiguës; beaucoup sont totalement immerses, d'autres émergent peu, d'autres enfin émergent de 30 et même 60 µm; les plus différenciées sont nettement renflées vers la base et à paroi épaisse de 2 à 3 µm, ne laissant ensuite qu'un canalicule étroit dans la partie conique qui est lourdement incrustée; elles sont parfois groupées en faisceaux. Les cystides d'un deuxième type, plus dispersées que les précédentes, sont cylindriques obtuses, longues de (30)-75-130 µm, et peuvent émerger jusqu'à 90 µm, ce qui les rend très visibles; la partie émergente est parfois élargie, spatulée, x 7-9-11 µm au sommet, nue ou finement engaînée d'un mince dépôt; la partie immerse, large de 8-11-(15) µm a une paroi un peu épaissie et avec une gaîne de cristaux; leur contenu est homogène ou s'est rétracté laissant 1 à 5 cloisons de retrait. Basides étroitement claviformes, 25-32-(45) x 5-6-(7) µm, sans boucles, avec 4 stérigmates longs de 5-7 µm, au contenu riche en gouttes réfringentes. Spores petites, ellipsoïdes à subovoïdes, 3,75-5-(6) x 2-3 µm, uni- ou biguttulées, uninucléées, à paroi lisse, non amyloïde. $\bar{x}$ = 4,25 ± 0,23 x 2,67 ± 0,16 µm pour LY 13182; 4,34 ± 0,27 x 2,79 ± 0,21 pour 13685.

Les cordonnets sont constitués d'hyphes parallèles, x 3,5-10 µm, à paroi le plus souvent mince mais parfois épaisse de 1-1,5 µm, aux articles longs avec boucles éparses, parfois opposées sur les hyphes de 9-10 µm; l'extérieur des cordons est couvert d'hyphes longuement incrustées, x 3,5-6 µm, branchues, cystidiformes à extrémité rétrécie. Récoltes: nombreuses, toujours au sol, sur bois plus ou moins enfoui. Nous la connaissons de l'Ain, du Rhône, de Savoie, Haute-Savoie, des Yvelines (legit M. Duverger, et R. Hentic), du Var, de la Haute-Garonne, des Landes et des Pyrénées atlantiques. Les supports sont variés: *Robinia, Ulmus, Populus, Alnus, Salix cinerea* et *babylonica, Buxus, Clematis, Prunus laurocerasus,* mais aussi sur bambous (*Phyllostachis* sp., leg. F. Candoussau); rencontré une fois sur *Pinus* en Savoie. Nous l'avons reçue récemment de Suisse italienne, sur *Phyllostachis* (leg. E. Zenone).

Le type récolté sur *Fagus silvatica* sur le Larzac (Aveyron), par A. Galzin (n° 3527) le 9 mai 1908, numéro 5637 de l'herbier Bourdot est semblable à nos récoltes. Il peut paraître étonnant que les cystides cylindriques, obtuses ou même spatulées, très émergentes n'aient pas été signalées jusqu'ici. Bourdot & Galzin (1928) parlent toutefois de cystides "émergentes des deux tiers" sans préciser leur forme. Ces cystides sont plus difficiles à déceler sur matériel d'herbier que sur le frais, car la partie émergente, à paroi mince, s'affaisse ou se collapse aisément. Après étude attentive, en milieu basique, on peut apercevoir quelques cystides cylindriques typiques sur le type vieux de près de 85 ans.

Caractères culturaux de *Scopuloides leprosa:*

Monospermes: les 2 monospermes 508 (Boidin 1958, p. 136) et les 14 monospermes de LY 15399, étudiés sur lame gélosée sont dépourvus de boucles vraies; on peut parfois observer de rares tentatives, ou même des formations évoquant une boucle. Les articles renferment 5 à 18 noyaux sauf le terminal qui en contient de 20 à 50. Les croisements 508 x 15399 donnent naissance à un mycélium à boucles nombreuses, mais inconstantes, ce qui révèle l'hétérothallie de cette espèce holocénocytique (voir ci-après).

Recherche de la polarité: les 14 haplontes LY 15399 ont été appariés 2 à 2. A quinze jours, les boîtes ont deux aspects différents: soit une bande apparement vide de mycélium à la ligne de contact (notées V), soit elles montrent un faisceau de mycélium aérien lâche aux deux extrémités de la ligne de contact (notées F); seules 4 confrontations ne peuvent être classées dans l'une ou l'autre de ces catégories. Après un mois, toutes les boîtes notées F montrent un mycélium riche en boucles, alors qu'il

n'y en a aucune dans les boîtes notées V. Dans les confrontations positives, toutefois, les boucles peuvent être localement rares, mais l'on peut voir cependant des hyphes x 3-4 µm montrant plusieurs cloisons successives bouclées. Dans les confrontations négatives, on peut, comme avec les cultures monospermes observer quelques tentatives de boucles, ou même des formations rappelant de vraies boucles. Après étude attentives, on ne peut hésiter à distinguer les résultats positifs et négatifs, et l'ensemble des observations mène à un tableau de bipolarité, sans déficiences ni anomalies:

A1: 1-2-3-8-9

A2: 4-5-6-7-10-11-12-13-14

Un certain nombre de germinations prélevées ne s'étant pas développées cette bipolarité serait, sans doute, à confirmer avec un plus grand nombre de monospermes. A notre connaissance, cette hétérothallie démontrée par l'apparition des boucles (et non seulement par l'aspect macroscopique des confrontations) est exceptionnelle chez les espèces holocénocytiques, et confirme l'autonomie de *Sc. leprosa* par rapport aux autres *Phanerochaetoideae.*

Polyspermes (LY 508-13685-15238-15399):

Croissance: moyenne à rapide.

Aspect: marge régulière. A six semaines, mycélium appliqué, bas dans la partie moyenne de la culture qui a l'aspect d'un verre blanc opaque. Dans la partie jeune, maigre mycélium aérien élevé, blanchâtre à légèrement et localement saumon jaunâtre (7,5 YR 8/6). A la périphérie, le mycélium aérien grimpe contre le verre où parfois il tend à former des cordonnets.

Revers: totalement blanchi. Odeur: nulle ou très faible.

Microscopie:

Mycélium aérien: hyphes x 2-7-(8) µm, régulières, à paroi mince et boucles inconstantes, toujours simples, présentes sur les hyphes étroites comme sur les hyphes larges; les boucles sont nombreuses quand le mycélium aérien est bien développé, mais assez rares dans les zônes où il est pauvre, et alors plus faciles à observer sur des hyphes de 3-4 µm. Deux types d'éléments cystidiformes sont observés: des éléments au sommet large de 6-10-(13) µm, de longueur variable, (25)-60-130-(200), et ne mesurant que 2-3-(4) µm de largeur à leur naissance; le sommet peut porter un dépôt réfringent résinoïde; les autres éléments cystidiformes ont un sommet effilé, mesurent 85-160 x 2,5-5-(7) µm avec les cristaux qui les recouvrent; ils sont simples ou, plus souvent, fourchus une fois, ou plus rarement 2 ou 3 fois; leur paroi est mince à nettement épaissie. Le mycélium aérien des cordonnets vus contre le verre est formé d'hyphes parallèles, serrées, riches en boucles.

Mycélium submergé: hyphes moins régulières, x 2-6,5-(7) µm, à boucles plus rares, à paroi mince ou parfois épaisse jusqu'à 1 µm sur les plus larges.

Cytologie: hyphes à boucles inconstantes mais nombreuses; les articles contiennent 4-10-(14) noyaux sauf les terminaux qui en montrent 18 à 54.

Oxydases:	ac. gallique: ++++(+), 0	gaïacol: +++++, 0
	p.-crésol: -	tyrosine: -, 20 mm.

CODE: 2a-3i-13-21-32-36-40-43 ou 44-54-59-66

Scopuloides leprosa est bien caractérisé, en culture, par ses 2 types de cystides et par son hétérothallie bipolaire.

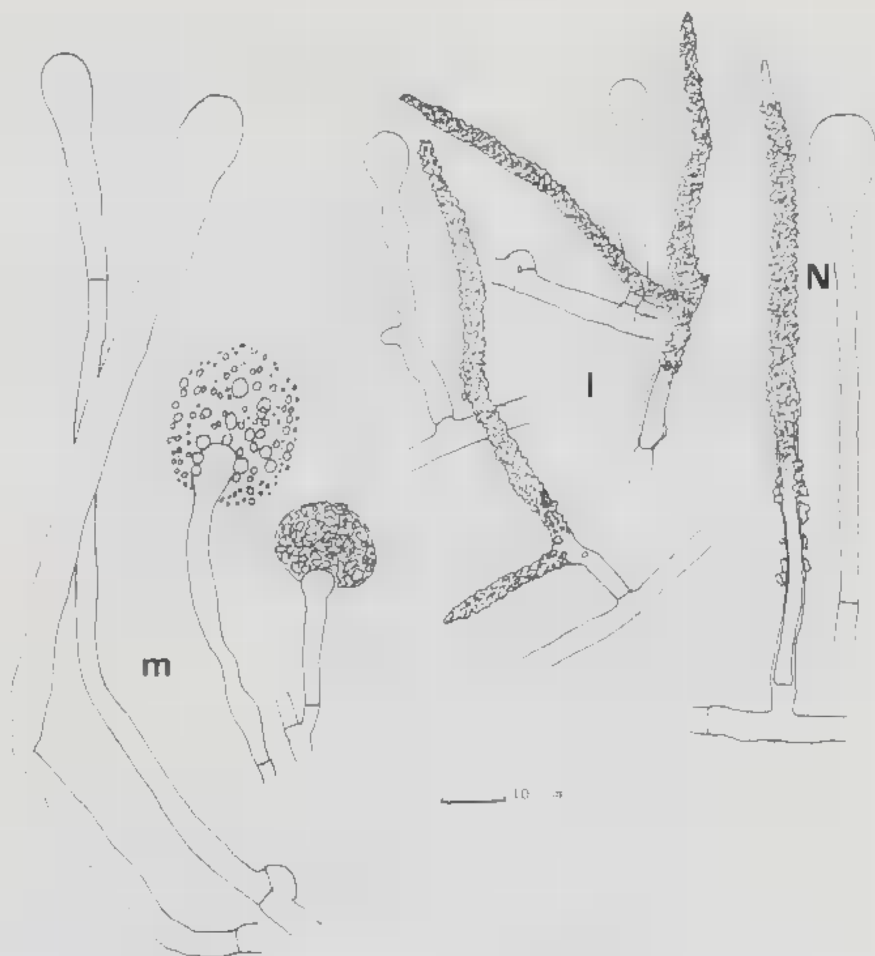


Planche III - *Scopuloides leprosa:* culture polysperme de LY 15399: l- jeunes éléments capités et hyphes cystidiformes observés sur lame gélosée; m- éléments capités qui peuvent porter des dépôts observés à la marge; N- élément cystidié et élément capité sur milieu de Nobles à 6 semaines.

Origine des récoltes citées: LY 508, sous une souche de feuillu, Couzon-au-Mont-d'Or (Rhône), 30 avril 1950; 13182, sur feuillu, Signes (Var), 18 novembre 1987; 13685, sur *Robinia*, St. Bernard (Ain), 20 mars 1989; 15238, id., 25 septembre 1992; 15399, id., 9 janvier 1993.

Dans sa monographie de 1985, H.H. Burdsall synonymise cette espèce à *Phanerochaete velutina* (DC: Fr.) Karst., mais ajoute: "the variability encountered in *P. velutina* suggests that more than one taxon is present among the specimens examined". Il s'agit d'une espèce particulière par ses deux types de cystides, caractère relevé par Burdsall chez le *Ph. luteo-aurantiaca* (Wakef.) Burds. de Nouvelle Zélande, mais ce dernier n'a pas les cystides obtuses et nues de grande taille de notre espèce. On trouve, par contre, des cystides de deux types, les unes fusiformes, les autres cylindriques au

sommet des aiguillons chez *Scopuloides hydnoides* (Cooke & Mass.) Hjortst. & Ryv. (que Burdsall synonymise à *Ph. rimosa* (Cooke) Burds., ce que refusent Eriksson et al. (1984)). Le subiculum nul ou très peu développé de notre espèce nous la fait mettre auprès de cette dernière dans le genre *Scopuloides*, où nous placerons aussi *Ph. ravenelii*.

Clé des *Scopuloides* d'Europe:

1- Un seul type de cystides; basidiome lisse, souvent épais; spores cylindriques parfois un peu déprimées, binucléées, 4-5 x 2,5-3 µm (= *Pen. roumeguerei* (Bres.)) ....*Scopuloides ravenelii* (Cooke) nov. comb.*

1- Deux types de cystides; spores uninucléées. 2

  2- Spores allantoïdes, 3,5-4-(5) x 1,8-2,2 µm; basidiome odontioïde ....*Scopuloides hydnoides* (Cooke & Mass.) Hjortst. & Ryv.

  2- Spores ellipsoïdes, 4-5-(6) x 2-3 µm; basidiome sublisse à faible tendance subodontioïde; souvent des cordonnets; à la marge hyphes incrustées ramifiées ....*Scopuloides leprosa* (Bourd. & Galz.)

REMERCIEMENTS

Nos remerciements s'adressent à Madame F. Candoussau, à MM. B. Duhem, M. Duverger et R. Hentic pour l'envoi de récoltes intéressantes, ainsi qu'à J.-Cl. Léger pour les diagnoses latines. Nous remercions aussi le laboratoire de Cryptogamie du Muséum National d'Histoire Naturelle de Paris et l'herbier de Kew pour le prêt de spécimens types.

BIBLIOGRAPHIE

BOIDIN J., 1958 - Essai biotaxonomique sur les Hydnés résupinés et les Corticiés; étude spéciale du comportement nucléaire et des mycéliums. Mém. hors-série, *Rev. Mycol. Paris*, 390 p., 103 fig. 10 pl.

BLANCO M.N., HJORTSTAM K., MANJON J.L. y MORENO G., 1989 - Estudios micologicos [redacted] el Parque natural de Monfrague (Extremadura, España) III. Aphyllophorales. *Cryptogamie, Mycol.* 10: 217-225.

BOURDOT H. et GALZIN A., 1912 - Hyménomycètes de France, IV Corticiés. *Bull. Soc. Mycol. France* 28: 349-409.

BOURDOT H. et GALZIN A., 1928 - *Hyménomycètes de France.* Paris, Lechevalier, 762 p.

BURDSALL H.H., 1985 - A Contribution to the Taxonomy of the Genus *Phanerochaete* (Corticiaceae, Aphyllophorales). *Mycol. Mém.* 10: 165 p., Cramer édit.

ERIKSSON J., HJORTSTAM K. and RYVARDEN L., 1978 - The *Corticiaceae* of North Europe. 5: 889-1047, Fungiflora, Oslo.

ERIKSSON J.,HJORTSTAM K. and RYVARDEN L., 1981 - Id., 6: 1051-1276.

ERIKSSON J., HJORTSTAM K. and RYVARDEN L., 1984 - Id. 7: 1281-1449.

MUNSELL Soil Color Charts 1954, Baltimore, Maryland, U.S.A.

* *Peniophora ravenelii* Cooke, Grevillea 8: 21, 1879.

NAKASONE K.K., 1990 - Cultural studies and identification of wood-inhabiting *Corticiaceae* and selected Hymenomycetes from North America. *Mycol. Mem.* 15: 412 p., Cramer édit.

NOBLES M.K., 1965 - Identification of cultures of wood-inhabiting Hymenomycetes. *Canad. J. Bot.* 43: 1097-1139.

PARMASTO E., 1967 - *Corticiaceae* U.R.S.S. IV Descriptiones taxorum novorum. Combinationes novae. *Eesti NSV Tead. Akad. Toim.* 16: 377-394.

REID D.A., 1965 - May fungi in Portugal. *Rev. Biolog.* 5: 135-158.

UTILIZATION OF HYDROCARBONS BY FUNGI

S.K. HEMIDA, M.M.K. BAGY and A.M. KHALLIL

Botany Department, Faculty of Science, Assiut University, Assiut, Egypt.

ABSTRACT - Utilization of benzene, kerosene and solar by fungi has been studied during 60 days period when incorporated in soil. The results of hydrocarbon-treated soils [illegible] two doses (5% and 40%) on glucose-agar (1%) with or without 1% hydrocarbon were nearly similar. Thirty species of fungi and one variety belonging to 14 genera were isolated from hydrocarbon free soil (11 genera, 24 species and 1 variety), benzene-(5 genera, 12 species and 1 variety), kerosene-(7 genera and 17 species) and solar-treated soils (8 genera, 19 species and 1 variety) on glucose-agar. *Amorphotheca resinae, Aspergillus flavus, A. fumigatus, A. niger, A. terreus, Emericella nidulans, Fusarium solani, Penicillium funiculosum, Rhizopus stolonifer* and *Trichoderma harzianum* were the most prevalent species of one or more hydrocarbons. The results obtained showed there are no hydrocarbon utilizing fungi characteristic of benzene, kerosene and solar.

RÉSUMÉ - L'utilisation par des champignons, de benzène, de kérosène ou de solar, incorporés dans le sol, a été étudiée sur une période de 60 jours. Les résultats obtenus sont sensiblement les mêmes, quand les sols sont traités par 5% ou 40% d'hydrocarbures et les isolements réalisés sur glucose-Agar (1%), complété ou non par 1% d'hydrocarbure. Au total, 30 espèces et 1 variété, appartenant à 14 genres ont été isolées du sol sans hydrocarbure (11 genres, 24 espèces, 1 variété), du sol traité par le benzène (5 genres, 12 espèces, 1 variété), du sol traité par le kérosène (7 genres, 17 espèces) et du sol traité par le solar (8 genres, 19 espèces, 1 variété). *Amorphotheca resinae, Aspergillus flavus, A. fumigatus, A. niger, A. terreus, Emericella nidulans, Fusarium solani, Penicillium funiculosum, Rhizopus stolonifer* et *Trichoderma harzianum* sont les espèces les plus couramment isolées sur un ou plusieurs des hydrocarbures étudiés. Aucune des espèces isolées n'est spécifique du benzène, du kérosène ou du solar.

INTRODUCTION

Microorganisms play an important role in natural removal of petroleum hydrocarbons from contaminated ecosystems. Fungi capable of metabolizing hydrocarbons are limited, with most reported to occur whithin the orders, Mucorales (Zygomycetes) and Moniliales (Hyphomycetes) (Nyns et al., 1968; Walker et al., 1976). Thus the ability of fungi and yeasts to utilize pure aliphatic hydrocarbon (n-alkanes) as sole carbon and energy sources is a well-documented phenomenon reviewed by Klug & Markovetz (1971). The fate of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) has received attention recently since benzo (a) pyrene and similar compounds were shown to be toxic, carcinogenic and/or mutagenic. Fungi have been shown to oxidize PAH in a manner similar to that found in mammals (Cerniglia, 1981).

In Egypt, Hemida (1991) isolated several fungal species from oil-polluted soils collected from different gas stops. Recently, Bagy et al. (1992) reported on naphthalene-anthracene utilizing microorganisms (bacteria and fungi). The present investigation

was undertaken to study utilization of 3 hydrocarbons (benzene, kerosene and solar) by fungi.

MATERIALS AND METHODS

Hydrocarbon-treated soil

Clay soil collected from the University farm was used in this study. 500 g aliquot of air-dry sieved soil was placed in ■ polyethylene bag and thoroughly mixed with commercial benzene or kerosene or solar. The water content of the soil was adjusted to 28% W.H.C.. Each hydrocarbon was added to soil in two doses (5% and 40%). The treatments were set up in duplicates in addition to the control (untreated soil). They were then incubated at 28°C (+ 2°C) for 60 days. After 7, 30 and 60 days, soil samples were taken and assayed for their fungal counts.

Determination of hydrocarbon utilizing fungi

Each hydrocarbon-treated soil was analysed for its fungal population using the dilution plate method (Johnson & Curl, 1972) on glucose-Czapek's agar (10 g/L) with or without 1% of hydrocarbon. Rose bengal (66 ppm) was employed as a bacteriostatic agent. Incorporation of rose bengal in the soil dilution plate has also the advantage of restricting the size of spreading colonies of fungi and therefore, large numbers of fungal colonies appear on the plate. Five plates were used for each treatment and the control and they were incubated at 28°C (+ 2°C), for 7-15days, during which the developing fungi were examined, identified and counted.

The following references were used for the identification of fungal genera and species: Raper & Thom (l949), Raper & Fennell (1965), Rifai (1969), Booth (1977) and Bomsch et al. (1980).

RESULTS AND DISCUSSION

Fungi recovered from hydrocarbon free soil

Twenty-four fungal species and one variety belonging to 11 genera were recovered from untreated soil (hydrocarbon free) on glucose-Czapek's agar (Tab. 1). The total count of fungi after 7 days was higher than the initial count and then the count decreased after incubation for 30 and 60 days. This means that, some fungi could increase their numbers in soil deprived from any additive organic substrate. It is possible that these fungi could utilize remains of available food-materials or could benefit from the secondary activities in soil. *Amorphotheca resinae, Aspergillus carneus, Mucor circinelloides, Myrothecium verrucaria, Penicillium steckii* and *Scopulariopsis candida* were completely absent in the control samples. However, these fungal species were isolated from hydrocarbon-treated soils.

Fungi recovered from benzene-treated soil

The mycological analysis of benzene-treated soil revealed the isolation of 12 fungal species and one variety belonging to 5 genera on glucose-agar (Tab. 1). These numbers are considerably lower than those obtained from untreated soil (24 species and 1 variety, 11 genera). Moreover, the total count of fungi was consistently lowered than the control one at both doses used after all the experimental periods. The reduction in the fungal count could be attributed to the toxic effect of benzene on soil

Treatment	Untreated soil				Benzene-treated soil						Kerosene-treated soil						Solar-treated soil					
Dose	0%				5%			40%			5%			40%			5%			40%		
Period/day Fungal species	0	7	30	60	7	30	60	7	30	60	7	30	60	7	30	60	7	30	5	7	30	60
Total count	36.3	41.9	28.9	31.8	15.4	12.1	7.6	12.5	8.7	5.0	35.3	12.3	4.7	13.9	13.0	9.7	31.2	15.5	5.6	24.4	17.4	5.4
Acremonium strictum W. GAMS	-	0.3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Alternaria alternata (Fr.) KEISSLER	-	0.3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Amorphotheca resinae PARBERY	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10.0	5.8	-	-	-	-	-	-
Aspergillus alutaceus BERK. & CURT	-	-	-	0.3	-	-	-	-	-	-	0.3	0.2	-	-	-	-	0.7	0.1	-	0.1	-	-
A. carneus (VAN TIEGH.) BLOCHWITZ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.2	-	0.1	-	-	1.3	-
A. flavus LINK	3.7	1.3	7.0	4.9	-	-	-	0.3	-	-	2.0	0.1	0.1	-	-	-	-	0.3	-	-	1.0	-
A. flavus var. *columnaris* RAPER & FENNELL	-	1.3	-	-	-	-	0.1	0.3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3.1	1.4	0.3	1.1	[illegible]
A. fumigatus FRESENIUS	2.3	-	-	0.5	-	12.0	-	-	8.7	-	-	0.3	0.8	1.3	-	1.1	-	-	-	-	-	-
A. japonicus SAITO	0.3	-	-	-	-	-	4.7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A. niger VAN TIEGHEM	19.7	26.3	11.7	15.5	7.0	0.1	-	5.0	-	-	24.5	8.3	2.9	8.3	2.9	2.3	22.2	9.5	2.2	13.3	6.1	0.7
A. terreus THOM	1.7	4.7	1.7	2.7	6.7	-	1.7	3.0	-	-	3.7	0.9	0.4	2.6	-	-	1.7	0.5	2.5	7.7	2.3	1.1
A. ustus (BAINIER) THOM & CHURCH	0.7	-	-	1.8	-	-	1.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.7	-	-	-	-	0.1
Emericella nidulans (EIDAM) VUILLEMIN	-	1.0	2.3	3.8	-	-	-	0.3	-	-	1.7	0.8	0.1	0.3	-	-	0.3	1.2	0.4	-	1.5	1.3
Fusarium moniliforme SHELDON	-	0.7	0.2	-	-	-	-	-	-	-	-	0.2	-	0.7	-	-	1.3	-	-	-	-	-
F. oxysporum SCHLECHT	-	-	-	0.3	-	-	-	-	-	-	-	0.1	-	-	-	-	1.3	0.1	-	-	-	0.1
F. solani (MART.) SACC.	0.7	-	0.2	-	-	-	-	-	-	-	0.7	0.1	0.1	-	0.1	0.3	-	0.1	-	-	-	0.1
Mucor circinelloides VAN TIEGHEM	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.7	-	-	0.3	-	-
M. hiemalis WEHMER	-	0.3	0.3	-	-	-	-	-	-	-	0.3	0.1	-	-	-	-	-	-	-	-	0.1	-
M. racemosus FRESENIUS	-	-	0.3	-	-	-	-	-	-	-	-	0.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Myrothecium verrucaria (ALB. & SCHW.) DITM. EX FR.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.1
Neosartorya fischeri (WEHMER) MALLOCH & CAIN	0.7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Penicillium chrysogenum THOM	1.7	-	2.7	-	-	-	-	-	-	-	-	0.3	-	-	-	-	0.2	-	-	0.7	-	-
P. funiculosum THOM	0.7	-	2.0	0.7	0.7	-	-	0.7	-	-	1.7	-	-	0.7	-	-	-	-	-	2.0	0.3	-
P. islandicum SOPP	-	5.0	-	-	0.3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.3	-	-	-	-	-
P. jensenii ZALESKI	1.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P. oxalicum CURRIE & THOM	-	-	0.2	-	0.7	-	-	1.7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P. steckii ZALESKI	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.3	-	-	-	-	-
Rhizopus stolonifer (EHRENB.) LIND	1.0	-	-	0.2	-	-	0.1	-	-	-	0.3	-	0.1	-	-	-	-	0.1	0.1	-	0.1	-
Scopulariopsis candida (GUEGUEN) VUILLEMIN	-	-	-	-	-	-	-	0.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Trichoderma harzianum RIFAI	0.7	-	0.2	-	-	-	-	0.3	-	-	-	0.1	-	-	-	-	0.3	-	-	-	-	-
Trimmatostroma betulinum (CORDA) HUGHES	-	0.7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Table 1: Total counts (calculated per mg soil) of fungal species in soil treated with benzene or kerosene or solar on glucose-Czapek's agar at 28°C.

fungi. The above results were obtained on both glucose- and benzene- Czapek's agar (Tables 1, 2).

Six species and one variety of *Aspergillus* were isolated, these were *A. flavus* (at 40% after 7 days only), *A. flavus* var. *columnaris* (at 5% and 40% after 60 and 7 days, respectively), *A. fumigatus* (at 5% after 30 days and at 40% after 30 and 60 days), *A. japonicus* (at 5% after 60 days only), *A. niger* (at 5% after 7, 30 days and at 40% after 7 days), *A. terreus* (at 5% and 40% after 7, 60 days and 7 days, respectively) and *A. ustus* (at 5% after 60 days only). *Penicillium funiculosum, P. islandicum* and *P. oxalicum* were recovered at low and high doses after 7 days only. *Emericella nidulans, Scopulariopsis candida* and *Trichoderma harzianum* were isolated at 40% after 7 days. Fedorak & Westlake (1986) reported that isolates of *Paecilomyces, Verticillium, Beauveria* and *Penicillium* species were tested for ability to metabolize a variety of n-alkylbenzenes. Growth on dodecylbenzene yielded benzoic and phenylacetic acids [illegible] transient intermediates, and these acids supported growth of the isolates. Ratledge (1984) mentioned that microorganisms, i.e. bacteria, yeasts and moulds, can grow on a wide variety of hydrocarbons as sole sources of carbon and energy. They can partially oxidize an even greater range of such compounds. Also, he reported that, the list of compounds attacked is extensive and includes straight and branched chain alkanes, alkene, alicyclic, heterocyclic and aromatic hydrocarbons.

Fungi recovered from kerosene-treated soil

A total of 7 genera and 17 species were isolated from kerosene-treated soil on glucose-agar (Tab. 1). These numbers were higher than those obtained from benzene-treated soil. Also, the total count of fungi were regularly declined at both doses and with the lengthening of the experimental period, and the lowest count was estimated at 40% after 60 days.

Amorphotheca (= Cladosporium) resinae was isolated mostly from kerosene-treated soil at 40% after 30 and 60 days on both media (Tables 1, 2). In addition, it was isolated at 5% after 30 days on glucose-agar supplemented with 1% kerosene. The highest counts (10 and 12 colonies) of *A. resinae* were estimated at 40% after 30 days on glucose- and 1% kerosene-glucose-agar, respectively. Cabral (1980) reported that it was possible to verify the presence of *Cladosporium resinae f. avellaneum* as the principal contaminant in Jet fuel (Kerosene) from storage tanks, hose tips and aircraft integral fuel tanks. May & Neihof (1981) stated that, one of the most prevalent and troublesome contaminants found associated with fuels in contact with either fresh-water or seawater is *C. resinae.* Smucker & Cooney (1981) studied the growth of *C. resinae* on glucose and then transfered to medium with glucose or with kerosene as the sole carbon source. Carson & Cooney (1988) observed that cells of *C. resinae* form greater numbers of microbodies when grown on n-alkanes than when grown on glucose. In this study, *Aspergillus flavus, A. niger, A. terreus, Emericella nidulans, Mucor hiemalis, M. racemosus, Penicillium chrysogenum, Rhizopus stolonifer* and *Trichoderma harzianum* were decreased at both doses of kerosene but with variable degrees. However, *A. alutaceus, A. carneus, A. fumigatus, F. solani* and *P. funiculosum* were promoted at some treatments (Tab. 1). Bemmann & Voigt (1980) isolated thermophilic n-alkane assimilating hyphae fungi and strains of *Aspergillus fumigatus* and *Mucor lusitanicus* selected from physiological investigation. Hussein & Abdel-Gawad (1983) studied the protease and amylase activities of the marine fungus *A. flavus* grown on glucose, methanol, kerosene or sodium formate as the sole carbon source. Bemmann et al. (1978) studied the cultivation of *A. niger* in n-alkanes.

Treatment	Benzene-treated soil										Kerosene-treated soil										Solar-treated soil									
Period day		7			30			60				7			30			60				7			30			60		
Dose / Fungal species	Control	0%	5%	40%	0%	5%	40%	0%	5%	40%	Control	0%	5%	40%	0%	5%	40%	0%	5%	40%	Control	0%	5%	40%	0	5%	40%	0%	5%	40%
Total count	84.9	25.7	13.4	10.3	24.0	12.0	9.1	25.5	7.3	6.0	19.6	38.3	34.0	9.0	20.7	7.1	12.1	21.5	5.0	6.3	26.3	23.0	13.6	19.3	17.8	8.3	5.7	16.1	3.7	5.0
Acremonium strictum	-	0.3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Alternaria alternata	-	0.3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Amorphotheca resinae	-	0.7	-	-	-	-	-	0.2	-	-	-	-	-	-	-	0.1	12.0	0.2	-	6.0	-	-	-	-	-	-	0.1	-	-	0.1
Aspergillus alutaceus	-	-	-	-	-	-	-	0.2	-	-	-	-	0.3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.2	-	-
A. carneus	-	-	-	-	-	-	-	1.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A. flavus	26.3	0.7	1.0	-	7.5	-	-	3.5	-	-	-	-	-	-	5.5	-	-	5.0	-	-	-	0.7	-	-	-	0.3	0.4	-	0.2	0.3
A. flavus var. *columnaris*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.3	0.7	-	-	-	-	-	-	-	-	6.3	-	-	-	6.8	-	-	3.0	-	-
A. fumigatus	-	-	-	-	0.5	12.0	5.0	6.5	4.8	6.0	-	-	-	-	1.7	0.2	-	1.3	2.0	0.2	-	-	-	-	-	2.2	1.1	0.6	2.5	1.5
A. niger	30.3	16.3	4.3	3.7	13.5	-	0.1	13.3	1.3	-	4.3	29.0	21.2	6.7	12.3	6.6	0.1	34.2	2.3	0.1	3.0	15.3	8.3	12.7	11.0	5.8	4.1	10.2	1.5	2.6
A. sydowii	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A. terreus	-	1.0	5.3	1.0	1.6	-	-	0.7	1.2	-	3.3	-	6.7	1.7	-	-	-	-	-	-	4.0	-	4.6	5.3	-	-	-	-	-	-
A. ustus	-	-	-	-	-	-	-	2.8	-	-	0.3	-	[illegible]	-	-	-	-	0.8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.7	-	0.1
Emericella nidulans	-	-	-	1.0	0.2	-	-	1.8	-	-	-	-	2.3	-	-	-	-	-	-	-	-	0.3	-	0.3	-	-	-	0.8	-	-
Fusarium moniliforme	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.1	-	-	-	-	-	-	0.2	-	-	-	-
F. oxysporum	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.0	0.3	-	-	-	-	0.3	-	-	0.3	-	-	-	-	-	-	-	[illegible]
F. solani	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	[illegible]
Mucor circinelloides	-	-	1.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M. racemosus	-	-	-	-	0.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Myrothecium verrucaria	-	0.7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Neosartorya fischeri	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2.3	4.0	-	-	-	-	-	-	0.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Penicillium brevicompactum	-	0.7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.2	-	-
P. chrysogenum	-	0.3	1.5	1.7	-	-	-	1.1	-	-	1.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P. funiculosum	-	-	1.2	0.2	-	-	-	0.2	-	-	-	-	2.0	-	0.2	-	-	-	-	-	-	0.7	-	-	-	-	-	-	-	-
P. islandicum	-	4.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4.3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4.7	0.7	0.7	-	-	-	0.3	-	-
P. janczewskii ZALESKI	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P. oxalicum	-	-	0.3	0.3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.7	-	-
P. stackii	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Rhizopus stolonifer	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.3	-	-	-	-	-	-
Talaromyces luteus (SAITO) STOLK & SAMSON	-	0.7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Trichoderma harzianum	26.3	-	0.3	0.3	-	-	-	-	-	-	8.3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	11	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Table 2: Total counnts (calculated per mg soil) of fungal species in soil treated with benzene or kerosene or solar on 1% benzene -, kerosene -, or solar-Czapek agar ■ 28°C.

Fungi recovered from solar-treated soil

The number of genera and species obtained from solar-treated soil (8 genera, 19 species and 1 variety) was markedly higher than that obtained from benzene or kerosene-treated soils on glucose-agar. (Tab. 1). The total fungal count was regularly depressed than the control one at both doses after all the experimental periods. This is probably due to the toxic effect of solar. *Aspergillus* (6 species and 1 variety), *Emericella* (1 species), *Fusarium* (3 species), *Mucor* (2 species), *Myrothecium* (1 species), *Penicillium* (4 species), *Rhizopus* (1 species) and *Trichoderma* (1 species) were recovered from solar-treated soils at both doses (Tab. 1). On solar-Czapek's agar, *Amorphotheca resinae* was isolated at 40% after 30 and 60 days from solar-treated soil (Tab. 2). Hettige & Sheridan (1984) reported that, 12 monthly samples of diesel fuel from two bulk storage tanks were examined for the presence of fungal contamination during 1982-1983. They isolated over 25 fungal species of which *Cladosporium resinae* was the predominant fungus occurring in 98% of the samples followed by *Penicillium* spp. (93%). Davies & Westlake (1979) reported that oil-utilizing fungi were isolated from both oil-polluted and uncontaminated northern canadian soils using stationary enrichment technique. Twenty-eight out of the 34 fungi of types isolated were capable of growing on a variety of crude oils. The most frequently isolated species produced abundant small conidia, e.g. *Penicillium* and *Verticillium* spp. and are typical of genera which would normally be expected to grow on soil dilution plates. They also stated that 40 fungal types or strains have been shown to grow on whole crude oils. These included *Torulopsis* sp., *Beauveria bassiana*, *Chrysosporium* sp., *Paecilomyces* sp., *Penicillium* spp., *Trichoderma viride*, *Verticillium* spp., *Acremonium* sp., *Aspergillus niger*, *A. ochraceus*, *A. versicolor* and *Cladosporium* spp. However, the role that fungi play in the decomposition of oil in soil is unknown (Davies & Westlake, 1979). Mycelial organisms can penetrate insoluble substances such as oil and this increases the surface area available for bacterial attack. On the other hand, the studies of Walker & Colwell (1974 a, b) and Walker et al. (1975) showed that although bacteria initiated the degradation of a synthetic petroleum mixture, twice as much was degraded when bacteria, fungi and yeast were present. This synergism between microorganisms could result in an increase in the rate and amount of oil degraded than would be achieved individually. In Egypt, most of the preceding genera and species were isolated previously from oil polluted soils (Hemida, 1991; Bagy, 1992) and from naphthalene-anthracene utilizing microorganisms (Bagy et al., 1992).

In conclusion, the preceding results revealed that, numerous fungal species are able to utilize benzene or kerosene or solar. There are no hydrocarbon utilizing fungi characteristics of benzene, kersosene and solar.

REFERENCES

BAGY M.M.K., 1992 - Keratinophilic and non-keratinophilic fungi of oil polluted soils in Assiut, *Egypt. Bull. Fac. Sci., Assiut Univ.*, 21: 65-74.

BAGY M.M.K., SHOREIT A.A.M. and HEMIDA S.K., 1992 - Naphthalene-anthracene-utilizing microorganisms. *J. Basic Microbiol.* 32: 299-308.

BEMMANN W., MATHAI S. and TROGER R., 1978 - Studies on cultivation of *Aspergillus niger* in n-alkanes. *Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg.*, II, 133: 99-114.

BEMMANN W. and VOIGT A., 1980 - Physiological studies on thermophilic hydrocarbon utilizing hyphae fungi. *Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg.*, II, 135: 275-289.

BOOTH C., 1977 - The genus *Fusarium*, laboratory guide to identification of major species. Commonwealth Mycological Institute, Kew, England.

CABRAL D., 1980 - Corrosion by microorganisms of jet aircraft integral fuel tanks. Part. I. Analysis of fungal contamination. *Int. Biodeterior. Bull.* 16: 23-27.

CARSON D.B. and CONNEY J.J., 1988 - Spheroplast formation and partial purification of microbodies from hydrocarbon-grown cells of *Cladosporium resinae. J. Ind. Microbiol.* 3: 111-117.

CERNIGLIA C.E., 1981 - Aromatic hydrocarbons: metabolism by bacteria, fungi and algae. *Rev. Biochem. Toxicol.* 3: 321-361.

DAVIES J.S. and WESTLAKE D.W.S., 1979 - Crude oil utilization by fungi. *Canad. J. Microbiol.* 25: 146-156.

DOMSCH K.H., GAMS S. and ANDERSON T.H., 1980 - *Compendium of soil fungi.* Vol. I. London, England, Academic Press.

FEDORAK P.M. and WESTLAKE D.W.S. 1986 - Fungal metabolism of n-alkylbenzenes. *Environ. Microbiol.* 50: 435-437.

HEMIDA S.K., 1991 - Mycoflora of oil polluted soils in Assiut. *Bull. Fac. Sci. Assiut Univ.* 20: 183-190.

HETTIGE G. and SHERIDAN J.E., 1984 - Mycoflora of stored diesel fuel in New Zealand. *Int. Biodeterior.* 20: 225-228.

HUSSEIN M.M. and ABDEL-GAWAD E.M., 1983 - Protease and amylase activities of *Aspergillus flavus* grown on hydrocarbons and oxygenated hydrocarbons. *Biotechnol. Bioeng.* 25: 3197-3199.

JOHNSON L.F. and CURL E.A., 1972 - Method for research on ecology of soil borne pathogens. *Burgess. Soc.* 4: 97-102.

KLUG M.J. and MARKOVETZ A.J., 1971 - Utilization of aliphatic hydrocarbons by microorganisms. *Adv. Microb. Physiol.* 5: 1-43.

MAY M.E. and NEIHOF R.A., 1981 - Growth of *Cladosporium resinae* in Seawater/Fuel system. Publ. by: Society for Industrial Microbiology, Arlington, 781-787.

NYNS E.J., AUGUIERE J.P. and WIAUX A.L., 1968 - Taxonomic value of the property of fungi to assimilate hydrocarbons. *Antonie van Leeuwen-hoek* 34: 441-457.

RAPER K.B. and FENNELL D.J., 1965 - *The genus Aspergillus.* Baltimore, Maryland. Williams and Wilkins.

RAPER K.B. and THOM C.A., 1949 - *A manual of the Penicillium.* Baltimore, U.S.A. Williams and Wilkins.

RATLEDGE C., 1984 - Microbial conversions of alkanes and fatty acids. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 61: 447-451.

RIFAI M.A., 1969 - A revision of the genus *Trichoderma. Mycological Papers* 116: 56.

SMUCKER R.A. and COONEY J.J., 1981 - Cytological responses of *Cladosporium resinae* when shifted from glucose to hydrocarbon medium. *J. Microbiol.* 27: 1209-1218.

WALKER J.D. and COLWELL R.R., 1974a - Microbial degradation of model petroleum at low temperature. *Microbiol. Ecol.* 1: 63-95.

WALKER J.D. and COLWELL R.R., 1974b - Microbial petroleum degradations use of mixed hydrocarbon substrates. *Appl. Microbiol.* 27: 1053-1060.

WALKER J.D., AUSTIN H.F. and COLWELL R.R., 1975 - Utilization of mixed hydrocarbon substrate by petroleum degrading microorganisms. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 21: 27-29.

WALKER J.D., PETRAKIS L. and COLWELL R.R., 1976 - Comparison of the biodegradability of crude and fuel oils. *Canad. J. Microbiol.* 22: 598-602.

Cryptogamie, Mycol. 1993, 14 (3): 215-218

PILATOPORUS MAROCCANUS SP. NOV. A NEW POLYPORE OF THE *POLYPORUS PALUSTRIS* GROUP

Frantisek KOTLABA[1] and Zdenek POUZAR[2]

(1) Na Petrinach 10, 162 00 Praha 6, Czech Republic.
(2) Srbska 2, 160 00 Praha 6, Czech Republic.

ABSTRACT - *Pilatoporus maroccanus* Kotl. et Pouz., growing on living trunk of *Cupressus sempervirens*, is described [redacted] a new species from Morocco. Three new combinations in the genus *Pilatoporus* are proposed.

RÉSUMÉ - Les auteurs ont décrit l'espèce nouvelle *Pilatoporus maroccanus* trouvée au Maroc sur le tronc vivant de *Cuperssus sempervirens*. Ils ont proposé trois combinaisons nouvelles au genre *Pilatoporus*.

KEY WORDS : Aphyllophorales, polypores, *Pilatoporus*.

INTRODUCTION

During a touristic trip to Morocco in April 1992, the first author found an interesting polypore on the base of a live trunk of *Cupressus sempervirens* in Central (Moyen) Atlas Moutains which appeared to be a new, undescribed species, belonging to the genus *Pilatoporus* Kotl. et Pouz. 1990.

DESCRIPTION

Pilatoporus maroccanus *Kotlaba et Pouzar, sp. nov. (Fig. 1, 2).*

Carposomata annua, in juvenilibus elastice carnosa, in statu siccato suberose dura, lateraliter pileata (unguliformia), 4,5-5,5cm lata (radius 2-2,3cm) et 4,0-5,5cm crassa, in sectione triangularia, superficie irregulariter et leviter tuberculata, haud zonata (solum propius marginem leviter zonata), adpresse dense velutina, prope marginem usque glabrata, sordide straminea, prope marginem ochraceo-brunneolutea et in propria margine brunnea. Caro in sectione eburnea (unico cum zona grisea), sat crassa (ad basim usque ad 20mm), marginem versus abrupte attenuata, fibrillosa, sapore incuspicuo; tubuli pallide eburnei, non stratosi vel unistratosi, usque ad 1,8cm longi, ostiolis distincte griseis (sicut ostiolis distincte griseis (sicut ostiola tubulorum Bjerkanderae adustae vel Trametis suaveolentis maturae), poris angulato-rotundatis, sat magnis (1-3 per 1mm), dissepimentis crassis.

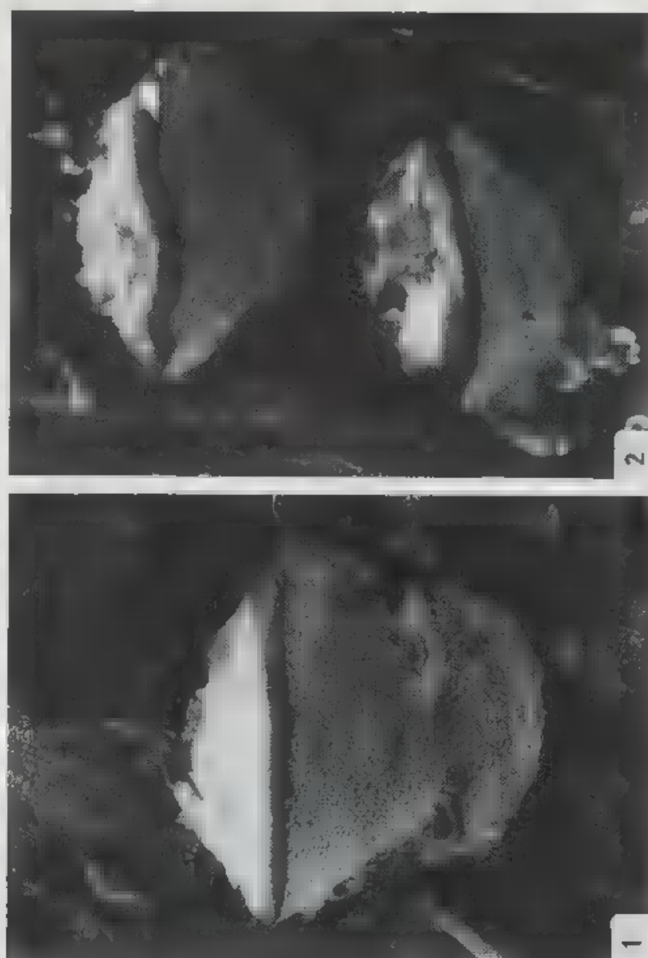


Fig. 1-2: *Pilatoporus maroccanus* Kotl. et Pouz. On *Cupressus sempervirens*. 8-10km north of Ifrane (south of Fes), North Morocco, 17.IV 1992. (1 - 1:1, 2 - 0.9x). Photo by F. Kotlaba.

Systema hypharum tramae trimiticum: hyphae generativae tramae tubulorum tenuitunicatae, ramificatae, conspicue fibulatae, 2,5-3,0µm crassae (in trama pilei crassiores, 2,8-4,5µm); hyphae ligativae tubulorum crassetunicatae, anguste canaliculatae, frequenter ramificatae, non fibuligerae, 2-3µm crassae (in trama pilei 1,5µm crassae); hyphae skeleticae tubulorum haud ramificatae, plerumque crassitunicatae usque subobliteratae (cum canaliculo peranusto), nonnullae tenuiter tunicatae, 2-5µm crassae, in trama pilei crassitunicatae, 4-6µm crassae.

Basidia clavata, 27-34 x 5,7-7,0µm, tetrasterigmatica, sterigmatibus usque ad 5µm longis; cystidiola absunt. Sporae 7,0-9,3 x 2,5-3,5µm, cylindrico-ellipsoideae nec non amyloideae, indextrinoideae, acyanophilae.

Putrefacio ligni brunnea.

Holotypus: Montes Atlas Medius, circa 8-10 km sept. versus Ifrane (meridio versus Fes), Marocco sept.; ad basim trunci vivi Cupressi sempervirentis apud viam, 17.IV.1992, leg. F. Kotlaba, det. F. Kotlaba et Z. Pouzar (PRM 842893).

Carpophores annual, pileate, sessile, bracket-like, soft when young, corky hard when dried, 2-2.3cm wide, 4.5-5.5cm long and 4-5.5cm high, surface of the pileus irregularly faintly tuberculate, finely velutinate, margin glabrous, dirty straw-yellow; tubes pale ivory, up to 1.8cm long, pores distinctly grey (as *Bjerkandera adusta* or in mature *Trametes suaveolens*), angular-rounded, 1-3 per mm; context in section ivory with a single grey zone, fibrillose, of indistinct taste.

Hyphal system trimitic: generative hyphae ramified, 2.5-4.5µm wide, prominently clamped, thin-walled, hyaline; ligative (binding) hyphae richly ramified, 1.5-3µm wide, thick-walled, not septate; skeletal hyphae unramified, 2-6µm wide, mostly thick-walled, inamyloid, indextrinoid and acyanophilous.

Basidia tetrasterigmatic, clavate, 27-34 x 5.7-7µm; cystidioles absent. Spores 7-9.3 x 2.5-3.5µm, cylindric-ellipsoid or almost short-cylindric, sometimes slightly fusiform, thin-walled, with a smooth, inamyloid, indextrinoid and acyanophilous wall.

Type of rot brown.

Holotype: North Morocco, Moyen Atlas Mts, near the road about 8-10 km north of Ifrane (south of Fes), in lower part of the trunk of a living tree of *Cupressus sempervirens*, 17.IV.1992, leg. F. Kotlaba, det. F. Kotlaba and Z. Pouzar (PRM 842893).

DISCUSSION

This newly described polypore belongs to the group of closely related species around *Polyporus palustris* Berk. et Curt., the type of the genus *Pilatoporus* Kotl. et Pouz. (see Kotlaba & Pouzar, 1990). This group of polypores is sometimes classified either within the genus *Tyromyces* P. Karts. or the genus *Fomitopsis* P. Karst. *Pilatoporus maroccanus* parasitized a living cypress, a treee species which hosts a very few polypores or other macromycetes.

The most closely related species to *Pilatoporus maroccanus* seems to be *Pilatoporus ibericus* (Melo et Ryv.) Kotlaba et Pouzar, comb. nov. (basionymum *Fomitopsis iberica* Melo et Ryvarden, *Bol. Soc. Brot.*, Lisboa, ser. 2, 62: 228, 1989), described recently from Portugal (Melo & Ryvarden, 1989). It differs from *Pilatoporus maroccanus* in having white to yellowish pores which are smaller (3-4 per mm) and slightly shorter spores, 6-8 (-8.5)µm long, whilst the host trees are different.

The other species, which also belong to the genus *Pilatoporus*, viz. *Pilatoporus meliae* (Underw.) Kotlaba et Pouzar, comb. nov. (basionymum *Polyporus meliae* Underwood, *Bull. Torrey Bot. Club*, New York, 24: 85, 1897) and *Pilatoporus nivosus* (Berk.) Kotlaba et Pouzar, comb. nov. (basionymum *Polyporus nivosus* Berkeley, *Journ. Bot.*, red. Hooker, London, 1: 196, 1856) differ, according to Gilbertson & Ryvarden (1986), both in their very small pores (5-8 per mm) and somewhat narrower spores (2-3µm). The last species belonging here is *Pilatoporus epileucinus* (Pilat ex Pilat) Kotl. et Pouz., which differs in its very small pores (4-5 per mm) and very narrow spores (1.5-2.5 µm).

REFERENCES

GILBERTSON R.L. and RYVARDEN L., 1986 - *North American polypores.* Oslo, Fungiflora, 1, 433 p.

KOTLABA F. and POUZAR Z., 1990 - Type studies of polypores described by A. Pilat - III. *Ceska Mykol.* 44: 228-237.

MELO I. and RYVARDEN L., 1989 - *Fomitopsis iberica* Melo et Ryvarden sp. nov. *Bol. Soc. Brot.*, ser. 2, 62: 227-230.

MORPHOLOGICAL DIFFERENCES BETWEEN *OPHIOSTOMA PICEAE* AND *O. QUERCI*, AND AMONG *O. QUERCI* ISOLATES

Krystyna PRZYBYL* and Michel MORELET**

* Institute of Dendrology, Polish Academy of Sciences, 62-035 Kornik, Poland.
** Laboratoire de Pathologie Forestière, INRA Nancy, 54280 Champenoux, France.

ABSTRACT - *Ophiostoma querci* differs statistically from *O. piceae* in lengths of synnematal conidiogenous cells, perithecial neck, ostiolar hyphae. Also the differences in synnemata hight, ascocarp base diameter, ascospores shape and in the germination rate of synnematal conidia on SNA at 25°C were found. Differences in colony morphology, synnematal production and length of the *Sporothrix* primary conidia among *O. querci* isolates are also presented. The atypical strain 88A from Poland (only in anamorphic condition but compatible with the mating type A of *O. querci*) could be a new variety of this species.

RÉSUMÉ - Cette étude montre qu'il est possible de distinguer par des critères morphologiques les deux espèces jumelles *Ophiostoma querci* et *Ophiostoma piceae*. Elle a porté sur 14 souches monospores d'origines variées (10 *O. querci* dont les 2 géniteurs A et B du néotype de *O. querci*, et 4 *O. piceae*). L'incompatibilité sexuelle de ces 2 espèces, la première inféodée aux Feuillus, la seconde aux Conifères a été vérifiée. Puis des différences significatives ont été relevées aux niveaux de la longueur des cellules conidiogènes des corémies (plus longues chez *O. querci*); - de la longueur du col des périthèces (plus long chez *O. querci*); - de la longueur des soies ostiolaires (plus longues chez *O. piceae*). Des différences existent aussi en ce qui concerne la hauteur des corémies, le type de germination des conidies de ces dernières sur milieu SNA à 25°C, le diamètre des ascocarpes et la forme des ascospores. L'étude comparative des anamorphes de *O. querci* révèle une bonne homogénéité [illegible] niveau des caractères culturaux, de la production des corémies et de la taille des ramoconidies du stade *Sporothrix*, excepté pour la souche 88A d'origine polonaise. Celle-ci appartient à l'espèce *O. querci* puisque son croisement avec le géniteur A de *O. querci* est fertile, mais pourrait constituer une variété morphologique de cette espèce, du fait de ses caractéristiques qui la rapprochent du *Hyalodendron roboris* de Georgescu et al.

KEY WORDS : *Ophiostoma piceae*, *Ophiostoma querci*, *Quercus* spp., Oak, *in vitro* study.

I. INTRODUCTION

Ophiostoma piceae (Münch) H. et P. Sydow has been considered for a long time (Hunt, 1956, sub. nom. *Ceratocystis piceae* (Münch) Bakshi) as a fungus inhabitant of both hardwoods and conifers. Among its synonyms is *Ophiostoma querci* (Georg.) Nannf. (sub. nom. *Ceratostomella querci* Georgevitch) described from oak. This point of view was shared till recently by Upadhyay (1981) and Przybyl & de Hoog (1989).

Separation of these two taxa was proposed by Brasier & Kirk (1989) and Brasier & Webber (1990). The first mentioned of the above authors discovered that *O. piceae* isolates from hardwoods and conifers are reproductively incompatible, and although "morphologically similar, may be sibling species of *Ophiostoma*". The former authors concluded: "the name *O. querci* may need to be re-established for the hardwood taxon".

As no authentic material was available for *O. querci*, Morelet (1992) proposed for it a neotype from oak, allowing the application of this name to hardwood taxon. He also suggested ■ complementary morphological study between *O. piceae* and *O. querci*.

Furthermore, ■ strain of *Sporothrix* (88A) was isolated from a *Quercus robur* trunk in the Krotoszyn Forest District in Poland (Przybyl, in print), similar in the morphology of primary conidia to those of *Hyalodendron roboris* Georgescu and Teodoru (anamorph of *O. roboris*).

The aim of our work was to find morphological differences between *O. piceae* and *O. querci* and also to identify the taxonomic position of 88A strain.

II. MATERIAL AND METHODS

The 14 strains selected for experiments are listed in Table 1, and the following studies were carried out:

Colonies characters

The fungi were grown in Petri dishes with MA 3% (Malt agar Difco, pH 5.6) at 25°C in darkness. The radial growth of mycelium and colony characters of all studied strains were noted after 10 days, in 6 replications.

Anamorph characters

1. Synnemata

For examination of synnematal conidiogenous cells the isolates were grown in Petri dishes with BWA (Beer Wort Agar) at 25°C in darkness and examined after 10-15 days;

For measurements of synnemata height and of conidia length from synnemata, the isolates were grown in Petri dishes with MA at 25°C and synnemata were sampled after 10-15 days.

For the purpose of observation of their germination rate, drops of synnematous conidia suspension of *O. querci* and *O. piceae* were transferred separately onto SNA medium (Nirenberg, 1976) and incubated at 25°C in darkness.

2. *Sporothrix* primary conidia

The isolates were grown in Petri dishes with MA at 25°C in darkness and studied over 10-15 days. For the measurement of primary conidia the scant mycelium was taken when two colony types (scant and floccose) occurred.

Cultures	Locations	Fungi	Hosts
O.2	Cerilly, France	*O. querci* mating type A of neotype	*Quercus petraea*
O.80	Nogent sur Vernisson, France	*O. querci* mating type [redacted] of neotype	*Quercus sp.*
O.91	Blois, France	*O. querci*	*Q. petraea*
10A5	Krotoszyn, Poland	*O. querci*	*Q. robur*
88A	Krotoszyn, Poland	*O. querci*	*Q. robur*
180.69 CBS	Northern Ireland	*O. piceae*	*Picea sitchensis*
195A	Krotoszyn, Poland	*O. querci*	*Q. robur*
244A	Sulechow, Poland	*O. querci*	*Q. robur*
276	Sulechow, Poland	*O. querci*	*Q. robur*
318	Tuliszkow, Poland	*O. querci*	*Q. rubra*
336	Mysliborz, Poland	*O. querci*	*Q. robur*
468	Czechoslovakia	*O. piceae*	*Pinus sylvestris*
469	Czechoslovakia	*O. piceae*	*Picea abies*
470	Czechoslovakia	*O. piceae*	*Picea abies*

Table 1. Details of *Ophiostoma querci* and *O. piceae* studied.

Strains from Czechoslovakia and from CBS (the Netherlands) were send to K. Przybyl by J. Franknechtova in year 1991 and S. de Hoog in year 1988 respectively. The other strains were isolated and recognized by the authors in own laboratories.

Les isolats de Tchécoslovaquie et du C.B.S. ont été envoyés respectivement en 1991 par J. Franknechtova et en 1988 par S. de Hoog. Les autres ont été isolés et identifiés par les auteurs.

3. Measurements

Fifty measurements of the length of both the synnematal conidiogenous cells and *Sporothrix* primary conidia were made for each isolate growing in the conditions mentioned above. Pairwise comparisons of length means of synnematal conidiogenous cells were carried out with the LSD analysis of variance and in the case of *Sporothrix* primary conidia the Newman-Keuls method was used.

Teleomorph characters

Neck and ostiolar hyphae were examined from the perithecia produced on oak sapwood in using general method of mating reactions (Morelet, 1992).

1. Mating reactions

Crosses (with 3 replications of each) were carried out in the following combinations:

- between types A x B of *O. querci* isolates,
- between types A x B of *O. piceae* isolates
- between 88A and *O. querci* isolates,
- between 88A and *O. piceae* isolates.

2. Ascocarps

For examination 10 perithecia were taken from each replication (30 for each combination) of *O. querci* and *O. piceae* isolates 15 days after pairing. Lengths of perithecial neck and ostiolar hyphae were measured and statistically analysed with the Newman-Keuls method.

Also the drop of ascospores, collected from perithecia formed as a result of positive mating reaction, between 88A and *O. querci* isolate, was transferred onto MA (pH 5.6) and incubated for the first 10 days at 25°C in darkness and then at room temperature in light. Moreover, single - ascospore cultures were made using strongly diluted spore suspensions and taking each ascospore under lens microscope.

III. RESULTS

Colony morphology

Colonies attained over 10 days a diameter of 55-67 mm (an average of 64 mm) for *O. querci*, of 67-78 mm (an average of 72 mm) for *O. piceae*. Aerial mycelium was scant - floccose usually growing in sectors, whitish grey for *O. querci* isolates, felted white for 88A, felted, grey for *O. piceae*. Reverses were pale brownish in *O. querci* and *O. piceae* but uncoloured in 88A. Synnemata were produced abundantly all over the colonies or in the concentric zones of *O. querci*, frequently or abundantly over the colonies or in ■ broad band near the colony of *O. piceae*, whereas they were absent in the colony of 88A. Significant is the fact, that the synnemata in 88A cultures did not arise during 2 months of observations on MA at 25°C but were easily found on sapwood samples 2 weeks after inoculation.

Anamorphs characters

1. Synnemata

Lengths of branched and unbranched synnemata were between (130-) 350-500 (-600) μm for *O. querci* whereas for *O. piceae* between 200-700 (-800) μm.

Lengths of conidiogenous cells of synnemata ranged between 8.3 - 16.6 µm for all isolates of *O. querci* and 8.3 - 13.4 µm for isolates of *O. piceae*. Length means, of *O. querci* and *O. piceae* ranged for all studied isolates between 13.3 - 14.2 µm and 10.1 - 10.9 µm respectively. The values of length means of *O. querci* and *O. piceae* isolates were significantly different with a confidence level of $\alpha = 0.05$ in LSD analysis (Table 2).

In regard to the germination of synnematal conidia, various sizes of conidia resembling yeast-form cells, oblong to globose both in *O. querci* and *O. piceae* occurred on SNA at 25°C, after 24 hours. Differences between them in the germination rate of conidia were observed in 3 days. In *O. querci* well developed germinated tubes were found, whereas in *O. piceae* only initial germinations of conidia were observed.

FUNGI	STRAINS	MEANS*
O. querci	10A5	14,28 a
	195A	14,08 ab
	336	14,01 ab
	318	13,81 ab
	244A	13,74 ab
	88A**	13,74 ab
	276	13,28 b
O. piceae	468	10,86 c
	469	10,46 c
	180.69	10,13 c

Table 2. Pairwise comparisons of length means (µm) of synnemata conidiogenous cells.

Tableau 2. Comparaison de moyennes deux à deux des cellules conidiogènes du stade *Graphium* (longueur en µm).

* The data with common letters do not differ significantly (α= 0.05) with using the LSD method. Les données affectées d'une même lettre ne diffèrent pas significativement au seuil de 5% (test L.S.D.).

** 88A - The measurements of synnemata conidiogenous cells on sapwood samples.
Les synnema utilisés pour les mesures des cellules conidiogènes ont été prélevés sur milieu gélosé sauf dans le cas de 88A où ils l'ont été sur aubier de chêne.

Isolates	MA 25°C		
	Range	Mean value*	
68A	6,64 - 39,64	25,56 a	OPHIOSTOMA QUERCI
O.2	8,30 - 18,26	13,28 b	
0.80	8,30 - 23,24	12,55 b	
10A5	8,30 - 19,92	12,82 b	
195A	6,64 - 23,24	14,24 b	
244A	6,64 - 26,56	12,82 b	
276	8,30 - 26,56	15,39 b	
318	6,64 - 23,24	13,76 b	
336	8,30 - 26,56	13,96 b	
180.69	6,64 - 21,58	14,18 b	O. PICEAE
468	9,96 - 28,22	15,77 b	
469	9,96 - 28,22	14,04 b	

Table 3. Length of primary conidia (µm).
Tableau 3. Longueur des ramoconidies (µm).
*Data with common letters do not differ significantly ($\alpha = 0.01$) with using Newman-Keuls method.
Les données affectées d'une même lettre ne diffèrent pas significativement au seuil de 1% (Test de Newman-Keuls).

2. *Sporothrix* primary conidia

Primary conidia formed by sympodial growth on the apical part of the conidiogenous cells were hyaline, thin - and smooth walled, clavate, 0-2 septate for all studied isolates of *O. querci* (except 88A with 4% of 3-septate primary conidia) and 0-2 for *O. piceae*. Length of primary conidia ranged from 6.6 - 26.6 µm for the 8 *O. querci* isolates, (6.6-39.6 µm for 88A) and 6.6 - 28.2 µm for *O. piceae*. Maximal means length among all studied isolates reached 15.4 µm for *O. querci* and 15.8 µm for *O. piceae*. Isolate 88A with maximal mean length 25.6 µm differed statistically from *O. querci* and *O. piceae* values with confidence level of $\alpha = 0.01$ in the Newman-Keuls method (Table 3).

Teleomorph characters

1. Mating reactions

Positive mating reactions were observed only:
- between compatibility types of *O. querci* isolates
- between compatibility types of *O. querci* isolates and 88A
- between compatibility types of *O. piceae* isolates.

2. Ascocarps

Ascocarp bases for *O. querci* and *O. piceae* were between 90-160 (-190) µm and 100-180 (-200) µm respectively.

O. querci and *O. piceae* differed considerably in their length averages of both neck and ostiolar hyphae:

The mean length of *O. querci* neck, 1515 µm (maximally 1900 µm), was statistically larger than for *O. piceae*, where the average value amounted to 1092 µm and maximal value to 1600 µm. On the other hand the ostiolar hyphae length of *O. querci*, about 15 in number, was significantly smaller than for *O. piceae* about 25 in number. In the case of *O. querci* the ostiolar hyphae length was noted up to 36 µm (average value 21 µm) whereas in *O. piceae* it was up to 55 µm (average number 38 µm - Table 4).

Ascospores ranged (3.5-) 2.5 x 1.5 µm both for *O. querci* (allantoid in side view) and *O. piceae* (reniform in side view).

Ascospores from perithecia which were formed in cross 88A x *O. querci* were fertile. Indeed perithecia of F2 filial generation were obtained.

IV. CONCLUSIONS

Differences between *O. querci* and *O. piceae*

O. querci differs statistically from *O. piceae* in lengths of synnematal conidiogenous cells (longer in *O. querci*), perithecium neck (longer in *O. querci*) and ostiolar hyphae (longer in *O. piceae*).

Differences between 88A and *O. querci* isolates.

Isolate 88A differs from *O. querci* isolates in colony morphology (scant, floccose for 8 isolates, against felty for 88A), synnemata formation (they were absent during 2 months of observation in 88A) and length of *Sporothrix* primary conidia. In the case of 88A the length of primary conidia ranged between 6.64-39.64 µm (mean value

Mating reactions	Neck length (µm)	Ostiolar hyphae lenght (µm)
O. querci		
0.2 x 276	1200 - 1900	16,60 - 26,56
0.2 x 0.91	1200 - 1900	16,60 - 33,20
0.2 x 0.80	1100 - 1800	16,60 - 36,52
0.2 x 88 A	1200 - 2500	11,62 - 19,92
O. piceae		
180,69 x 468	900 - 1400	26.56 - 54,78
180.69 x 469	800 - 1600	21,58 - 49,80
180,69 x 470	600 - 1500	16,60 - 53,12
Average		
O. querci	1515,45 ■	21,31 a
O. piceae	1091,65 b	38,14 b

Table 4. Results of mating reactions.

Tableau 4. Longueur des cols et hyphes ostiolaires des périthèces obtenus en croisements *in vitro*.
Average number differ significantly ($\alpha = 0.05$) with using Newman-Keuls method.
Les moyennes diffèrent significativement au seuil de 5% (Test de Newman-Keuls).

25.56) and therefore was nearby those of *Hyalodendron roboris* 3.5-45 µm (Georgescu et al., 1948). Noted by mentioned authors 3-septate primary conidia were also observed in 88A isolate. The 88A gave fertile perithecia (with longer neck and shorter ostiolar hyphae, see Table 4) in cross with O.2 (the mating type A of the neotype of *O. querci*).

Descriptions of *O. querci* (including its neotype) and *O. piceae* based on our material

Ophiostoma querci (Georgevitch) Nannfeldt.
Synanamorphs: *Graphium pirinum* Goidanich
Sporothrix pirinum (Goidanich) Morelet

Colonies (55-) 57-67 mm in diam. over 10 days on MA at 25°C; aerial mycelium scant and floccose, whitish grey; growing in sectors; reverses pale brownish. Synnematal unbranched and branched (130-) 350-500 (-600) µm height, all over the colony or in the concentric zones. Synnematal conidiogenous cells 8-16 µm long produce slimy masses of oblong conidia (4.5-) 2.5 x 1.5 (-2.5) µm. *Sporothrix primary* conidia 7-27 µm long, hyaline, thin - and smooth walled, clavate, 0-2 septate.

Ascocarps partly embedded in the agar medium; bases brown, globose 90-160 (-190) µm in diam.; necks dark brown at the base, lighter toward the apex, 1100-1900 µm long including ostiolar hyphae: ostiolar hyphae about 15 in number, brownish at the base, often septate up 37 µm; ascospores allantoid in side view (3.5-) 2.5 x 1.5 µm.

The atypical morph 88A (only in anamorphic condition) differs from the above typical description in having aerial mycelium felty white, reverse uncoloured, synnemata production very slow after 2 months of incubation, *Sporothrix* primary conidia 0-3 septate up 40 µm long. Then 88A could be considered [redacted] a new variety into *O. querci*.

Ophiostoma piceae (Münch) H. & P. Sydow.
Synanamorphs: *Graphium piceae* (Crane & Schoknecht) Wingfield & Kendrick
Sporothrix sp.

Colonies attained a diameter of 79 mm (67-79 mm) over 10 days on MA at 25°C; aerial mycelium grey and felty, with frequent or abundant synnemata arising over colonies or in the broad band; reverses at first white later becoming pale brownish. Synnemata unbranched and branched 200-700 (-800) µm height; conidiogenous cells 8-13 µm long with slimy masses of oblong conidia (4.5-) 2.5 x 1 (-1.5) µm. *Sporothrix* primary conidia 7-28 µm long, hyaline, thin and smooth walled, clavate, 0-2 septate.

Ascocarps partly embedded in the agar medium; bases globose (sometimes elliptical) dark 100-180 (-220) µm in diam.; necks black at the base, becoming lighter at the apex, 600-1600 µm long including ostiolar hyphae. Ostiolar hyphae about 25 in number, septate up 55 µm long; ascospores reniform in side view (3.5-) 2.5 x 1.5 µm.

ACKNOWLEDGMENTS

This article is a result of an official cooperation between Pathological Laboratories of National Institute of Agriculture I.N.R.A. in Champenoux (France) and Institute of Dendrology in Kórnik (Poland). Some part of the results was obtained in Poland and some one in France during stay K. Przybyl in Champenoux in a framework of the cooperation. The authors thank Dr C. Delatour for discussions and for help in some statistical calculations. Thanks also to Mme Majenski and J.E. Menard for their technical participation.

REFERENCES

BRASIER C.M. and KIRK S.A., 1989 - European oak decline. *Rep. on Forest Research:* 47-48.

BRASIER C.M. and WEBBER J.F., 1990 - Status of *Ophiostoma piceae* on hardwoods and conifers. *An International Symp.*, Bad Windsheim, West Germany, 21-24 Aug., (Abstr.).

GEORGESCU C., TEODORU I. et BADEA M., 1948 - Le Dessèchement en masse du chêne. *Anal. Inst. Cerc. Exp. For., Bucarest* 11: 185-233.

HUNT I., 1956 - Taxonomy of the Genus *Ceratocystis*. *Lloydia* 1: 1-64.

MORELET M., 1992 - *Ophiostoma querci* sur chêne en France. *Ann. Soc. Sci. nat. Archéo. Toulon Var*, 44: 109-112.

NIRENBERG H., 1976 - Untersuchungen über die morphologische und biologische Differenzierung in der *Fusarium* - Sektion *Liseola*. *Mitteil. Biologischen Bundes Land und Forst Berlin - Dahlem* 169: 117 p.

PRZYBYL K. and HOOG G.S. de, 1989 - On the variability of *Ophiostoma piceae*. *Antonie van Leeuwenhock* 55: 177-188.

PRZYBYL K., (in print) - Some aspects on *Ophiostoma roboris* (syn. *O.querci*) studies. *Arb. Korn.* 37.

UPADHYAY H.P., 1981 - *A Monograph of Ceratocystis and Ceratocystiopsis.* The University of Georgia, Athens: 176 p.

ESSAI DE LUTTE BIOLOGIQUE CONTRE L'HELMINTHOSPORIOSE DE L'ORGE PAR L'UTILISATION D'UNE SOUCHE PEU AGRESSIVE DE *DRECHSLERA TERES*

M. MOSTAFA, G. BARRAULT et L. ALBERTINI

Laboratoire d'Ingénierie Agronomique, Ecole Nationale Supérieure
Agronomique, 145 avenue de Muret
31076 TOULOUSE Cédex, FRANCE

RÉSUMÉ - L'utilisation préventive d'une souche peu agressive de *D. teres* contre une souche parasite de l'orge, montre que l'application de la suspension mycélienne ou du filtrat brut sur le limbe foliaire provoque une réduction de l'attaque ultérieure par une souche agressive, qui se traduit à la fois par une diminution du nombre de sites d'infection et une réduction de la taille des nécroses. Le mésophylle du limbe d'orge confronté au filtrat toxique de la souche faible, et contaminé ultérieurement par une souche agressive est peu alteré par rapport au témoin.

ABSTRACT - The preventive use of a weakly aggressive strain against *D. teres*, the causal agent of barley net blotch, showed that the application of the mycelial suspension or of crude filtrate on the leaf lamina subsequently induced decreased attack by agressive strain, is reflected by the decreased number of infection sites and by the decreased size of necroses. Barley lamina mesophyll in the presence of the toxic filtrat of the hypoagressive strain, which was followed by inoculation with an aggressive strain, was little allowed with respect to that of the control plants.

MOTS CLÉS : Lutte biologique, Hypoagressivité, *Drechslera teres*, *Hordeum vulgare*.

INTRODUCTION

L'emploi de produits phytosanitaires constitue une menace pour les écosystèmes, par la pollution des eaux superficielles et souterraines. Ces produits peuvent également déclencher des manifestations pathologiques chez l'homme, liées d'une part à la présence de résidus dans les denrées alimentaires, et d'autre part aux risques inhérents à l'emploi de ces produits. Par ailleurs, l'utilisation généralisée ■ répétée de ces matières actives est susceptible d'entraîner la sélection de souches résistantes (Sheridan & Grabavac, 1985; Leroux, 1991). En outre, certains fongicides peuvent stimuler la croissance et la morphogenèse conidienne de certains pathogènes (Jordan & Best, 1981).

Dans ce contexte, la lutte biologique qui repose sur plusieurs mécanismes (antagonisme, compétition trophique, hyperparasitisme, et hypovirulence) peut constituer une méthode de lutte alternative tout à fait intéressante. Chez les champignons phytopathogènes, le phénomène d'hypovirulence ■ été observé chez *Gaeumannomyces graminis* où des souches hypovirulentes sont capables d'exclure la souche pathogène

virulente (Tivoli et al., 1974; Lemaire et al., 1982). Chez *Endothia parasitica*, parasite du châtaignier, les souches hypovirulentes transmettent ce caractère dans les souches virulentes (Grente & Sauret, 1969; Anagnostakis & Day, 1979; Jaynes & Elliston, 1981; Kuhlman et al., 1984). Dans le même ordre d'idées, l'action préventive d'une souche non pathogène d'*Alternaria alternata* sur le tabac réduit de 60% la sévérité des symptômes au champ (Spurr, 1977). Le trempage des boutures de patate douce dans une suspension conidienne d'une souche hypoagressive de *Fusarium oxysporum* entraîne une protection ultérieure de ces boutures contre les attaques consécutives à un repiquage dans un sol naturellement infesté par la souche pathogène (Ogawa & Komada, 1984).

Le but du présent travail est de contribuer à l'essai d'une méthode de lutte biologique par l'utilisation d'une souche peu agressive contre un parasite de l'orge, *Drechslera teres* (Sacc.) Shoemaker, anamorphe de *Pyrenophora teres* Drechs. dont le développement en France depuis 10 ans a été spectaculaire. Cette maladie peut être qualifiée de iatrogène dans la mesure ou l'environnement chimique stimule certaines séquences biologiques et épidémiologiques du pathogène (Toubia-Rahme et al., 1992). C'est actuellement une affection fongique majeure du complexe phytopathogène de l'orge susceptible de causer des chutes de rendement tangibles. La maladie peut être provoquée par les deux formes: *D. teres* f. *teres* et *D. teres* f. *maculata* (Barrault, 1989).

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1) Matériel fongique

Dix souches monoconidiennes polycaryotiques et hétérocaryotiques isolées à partir de différents cultivars provenant de diverses régions sont répertoriées sous forme alpha-numérique:

La lettre indique la nature du facies d'origine [R= facies réticulé (R_1, R_2, R_3, R_4, R_5) S= facies spot maculta (S_6, S_7, S_8, S_9, S_{10})]. Le chiffre indique le numéro de l'isolat à l'intérieur d'un même facies (Mostafa, 1982; Barrault, 1989).

Les souches de *D. teres*, ensemencées sur un milieu liquide, statique (V_8 à 10%) dans des fioles d'Erlenmeyer de 250 ml, à raison de 40 ml par récipient, sont mises à incuber à 23°C, à l'obscurité. Après 10 jours de culture, le mycélium est filtré sur un entonnoir cylindro-cônique à plaque filtrante, en verre borosilicaté (Φ 2, diamètre 70 mm) à l'intérieur duquel on place un filtre sans cendres Durieux N°III (filtration rapide), et finement dispersé à l'aide d'un broyeur "Auto-Mix" (6000t/mn pendant 1 mn) de sorte que la concentration finale en fragment de mycélium soit de l'ordre de 10^6 par ml.

2) Matériel végétal

Les plants d'orge (stade 3 feuilles) issus de semences d'orge (variété Thibaut) désinfectées à l'hypochlorite de sodium (10%) puis rincées énergiquement avec l'eau distillée, sont semées dans des bacs contenant du terreau préalablement stérilisé à la chaleur (120°C pendant 1 heure). Le terreau est humidifié périodiquement à l'aide d'une solution nutritive de Knop ($NaNO_3$ 1g; KNO_3, 0,25g; $MgSO_4$, $7H_2O$ 0,25g; KH_2PO_4 0,25g; $FeCl_3$ traces /1000 ml d'eau).

3) Détermination du pouvoir pathogène des dix souches de *D. teres*

La contamination (au stade 3 feuilles) par pulvérisation foliaire est réalisée sous la forme d'une suspension mycélienne (25 ml/bac) à laquelle on adjoint de la gélatine (0,25%)

Les plants d'orge ainsi contaminés sont recouverts d'un sac en plastique pendant 48h pour maintenir une humidité saturante favorable à la contamination et au développement du pathogène au cours de la phase d'incubation. Les essais se déroulent dans une serre où les paramètres climatiques sont les suivants: température= 18-20°C, humidité relative=85-95% et intensité lumineuse 12h/j($60 Wm^{-2}$).

Les essais sont réalisés en blocs randomisés avec 4 répétitions. L'analyse de variance est fondée sur la moyenne.

4) Confrontation de la souche la moins agressive (S_{10}) avec la souche la plus agressive (R_3) *in vivo*.

Les suspensions mycéliennes de R_3 et S_{10} comprenant 10^6 fragments/ml (20 ml) ont été appliquées soit simultanément, soit successivement. L'application de R_3 étant effectuée 24 heures ou 48 heures après celle de S_{10}. Un témoin (application de la souche R_3 seule) a été réalisé.

5) Etude de l'action du filtrat de la souche (S_{10})

Le filtrat de S_{10} est obtenu à partir de cultures effectuées sur milieu Fries (incubation pendant 10 jours à 23°C, à l'obscurité), puis filtrées stérilement sur un filtre GELMAN (Φ = 0,2 mm). Le filtrat brut a été expérimenté après dilution avec de l'eau distillée stérile, aux trois concentrations suivantes: 10%, 25%, et 50% du filtrat initial. La contamination par la souche R_3 est faite 24 heures ou 72 heures après l'application du filtrat.

Les plantes ayant reçu seulement la pulvérisation de fragments mycéliens de R_3 (10^6 fragments mycéliens/ml) constituent le témoin. L'intensité de la maladie est déterminée 10 jours après la contamination par R_3.

L'intensité de l'attaque est définie d'après une échelle de notation allant de 0 à 9 (0 = absence de symptômes, 1= < 2,5%; 2= 2,5% - 5%; 3= 5% - 10%; 4= 10% - 20%; 5= 20% - 30%; 6= 30% - 40%; 7= 40% - 50%; 8= 50% - 75%; 9= > 75%) de surface foliaire malade (nécrose + chlorose).

6) Anatomie foliaire

Les coupes (20 à 40 µm) réalisées à partir de fragments foliaires sains (témoin) et malades, sont obtenues au moyen d'un microtome à main. Les différentes coupes d'une série ont été réparties en 3 lots, le premier lot de coupes étant coloré pendant 5 mn. par le bleu coton-acétique (bleu coton C4B 5 g., acide acétique cristallisé 5g, eau distillée 100 ml), le second lot pendant 15 mn. par le bleu de résorcine à 1% dans l'éthanol à 95°: 0,1 ml + eau distillée (25 ml), le troisième lot pendant 30 min. par le rouge de Ruthénium (0,2% en solution aqueuse à pH 10).

Les coupes sont montées entre lame et lamelle dans une goutte de glycérine diluée au 1/2 dans du Deplex (milieu permettant le montage permanent des préparations sans déshydratation préalable).

RÉSULTATS

Détermination du pouvoir pathogène des dix souches de *D. teres*

L'examen de la Fig. 1 montre que quelle que soit la feuille considérée, la souche S_{10} apparaît être la moins agressive (l'intensité de la maladie est égale à 6 sur la 1ère feuille, et 2,1 sur la 2ème feuille). R_3 est en revanche la plus agressive (8,9 sur la 1ère feuille, et 4,8 sur la 2ème feuille).

Confrontation de la souche la moins agressive (S_{10}) avec la souche la plus agressive (R_3)

*** confrontation directe (mycélium)**

Les résultats de la figure 2 montrent que si la souche S_{10} est appliquée préventivement (48 h avant la contamination par la souche R_3) l'attaque sur les 1ère et 2ème feuilles est fortement diminuée par rapport à celle consécutive à une application simultanée S_{10} + R_3. Une application de R_3, 24h après celle de S_{10}, provoque sur la 2ème feuille une attaque dont l'intensité est intermédiaire entre les deux essais précités.

▪ confrontation indirecte (filtrat)

En complément de ces observations, il nous a paru intéressant d'étudier l'effet de différentes dilutions du filtrat de la souche S_{10} sur l'intensité de l'attaque de plantes d'orge, par la souche hyperagressive R_3.

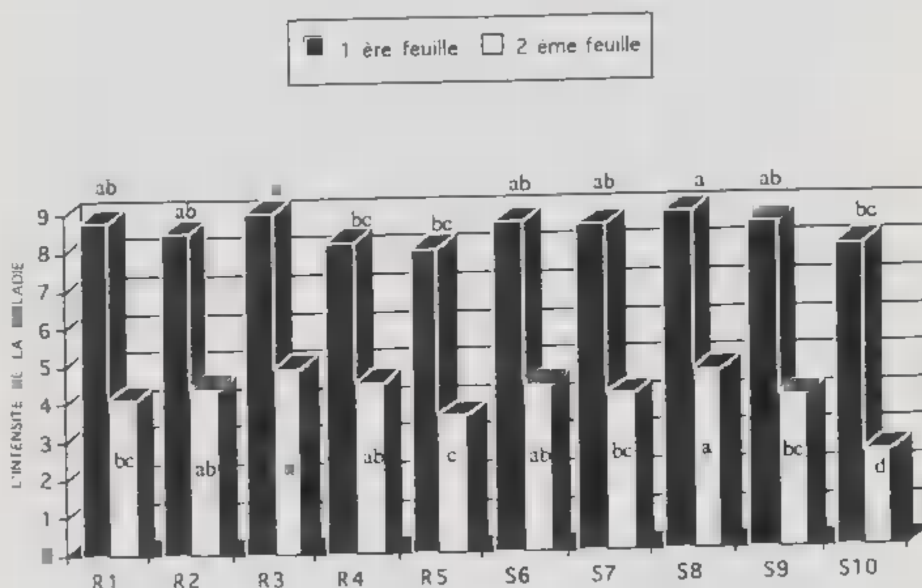


Fig. 1 - Agressivité de 10 souches de *D. teres* appréciée par le niveau de gravité des symptômes observés sur orge (var. Thibaut).

Fig. 1 - Effect of ten *D. teres* strains on the incidence of barley (var. Thibaut) net blotch.

Les moyennes suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil de 5% (Test de Newman - Keuls).

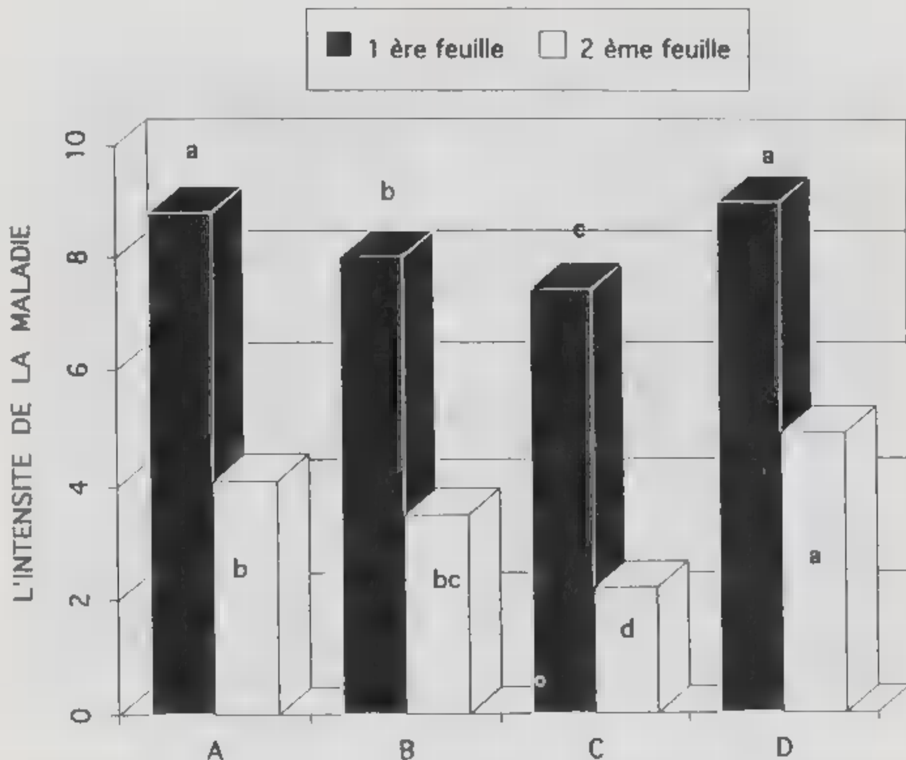


Fig. 2 - Agressivité de la souche R_3 de *D. teres* sur orge (var. Thibaut) en présence de la souche S_{10} inoculée en même temps, 24h et 48h après.

Fig. 2 - Aggressivity of barley (cv Thibaut) net blotch strain R_3 in the presence of strain S_{10} inoculated simultaneously or subsequently.

Les moyennes suivies de la même lettre ■ sont pas significativement différentes au seuil de 5% (Test de Newman - Keuls).

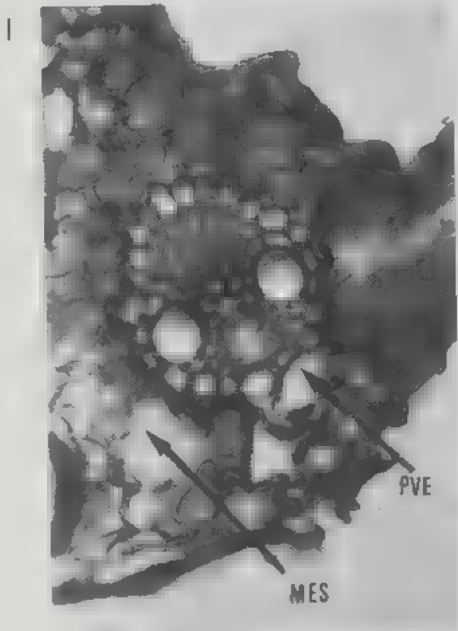
1 = R_3 et S_{10} simultanée
2 = S_{10} suivi de R_3 24h après
3 = S_{10} suivi de R_3 48h après
4 = Témoin R_3 seul.

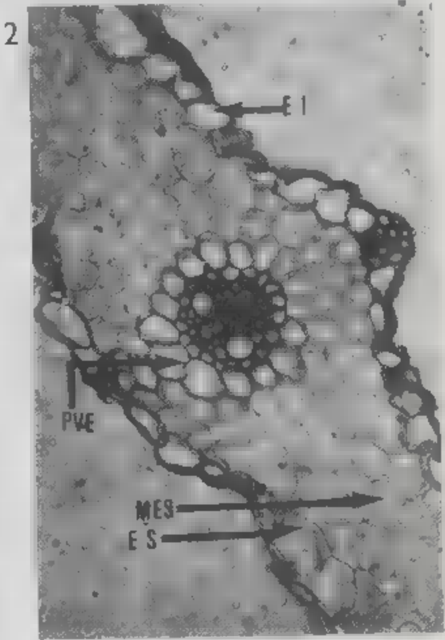
Le filtrat de S_{10} à 50%, est phytotoxique, il entraîne l'apparition de nécroses sur les feuilles. Les filtrats dilués à 10% et 25% ne sont pas phytotoxiques; ces derniers, appliqués 72h avant la contamination par R_3, réduisent très nettement la sévérité de l'attaque par R_3, sur la 2ème feuille (Tableau 1).

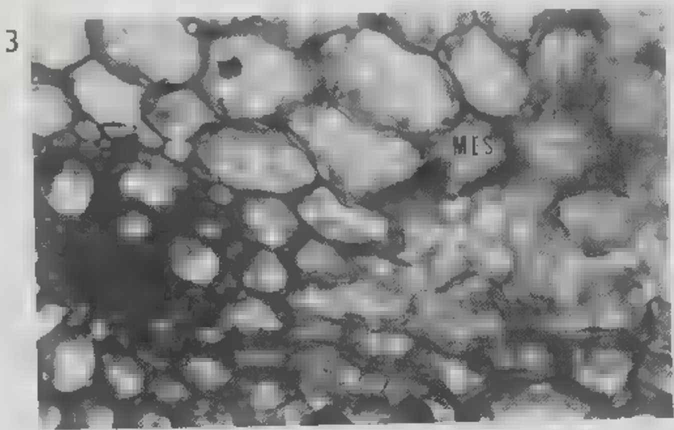
Anatomie foliaire (Planche 1)

Témoin R_3 (Photo 2)

Les cellules du parenchyme chlorophyllien ont subi dans la zone nécrotique d'importantes altérations qui se traduisent par un brunissement et un affaissement cellulaire; il en résulte une réduction de l'épaisseur de la zone altérée par rapport au

1


2


3


témoin. La paroi des cellules du parenchyme chlorophyllien perd de son intégrité, on voit apparaître des lacunes parfois assez grandes, qui jouxtent les faisceaux vasculaires. Alors que la paroi pecto-cellulosique des cellules de la gaine externe des faisceaux vasculaires se lyse fréquemment en désolidarisant ainsi les faisceaux du reste du limbe, les cellules de la gaine interne (à paroi subérifiée) et les éléments des faisceaux vasculaires (notamment du xylème) conservent une structure pseudo-normale.

Filtrat toxique appliqué 72h avant la contamination par R_3 (Photo 3).

Par rapport au témoin R_3 (Photo 2), les cellules des mésophylles et les cellules de la gaine périvasculaire externe restent quasi intactes, si ce n'est la présence de quelques lacunes de faible taille.

DISCUSSION

Dans la recherche de souches de faible agressivité de *D. teres* pouvant jouer un rôle dans le contrôle biologique du parasite, la souche peu agressive de *D. teres* (S_{10}) en tant que telle ou par l'intermédiaire de son filtrat de culture peut entraîner une réduction du taux d'infection par une souche hyperagressive R_3. Un certain délai est nécessaire entre la préinoculation par S_{10} et l'inoculation par R_3 pour permettre [redacted] phénomène de "prémunition" de s'exprimer (72h.) Matta (1966) et Littlefield (1969) ont obtenu une prémunition, respectivement contre la fusariose de la tomate et la rouille du lin, qui se maintient tout au long de la vie de la plante. Mas (1967), indique que l'effet de la pré-inoculation par la souche hypovirulente peut [redacted] traduire aussi par un retard dans l'apparition de la maladie.

Dans le cas de la préinoculation de l'orge avec le filtrat toxique de la souche S_{10}, on remarque que ce filtrat toxique confère [redacted] mésophylle du limbe une "résistance" relative à l'attaque de la souche R_3 de *D. teres*. Cette observation nous permet d'émettre l'hypothèse selon laquelle la souche S_{10} pourrait induire, chez l'hôte, la production de substances de défense qui entraveraient le développement du pathogène R_3 dans l'hôte en limitant ainsi la taille de la lésion produite par R_3. L'ensemble des travaux sur les phytotoxines de *D. teres* montrent qu'il existe deux toxines thermostables (A et B) pour les deux formes (R et S) non spécifiques, dialysables et de faibles poids moléculaires; elles réagissent positivement à la ninhydrine et sont apparentées à des peptides (Smedegard-Petersen, 1977). Les toxines A et [redacted] ont été isolées à partir de feuilles malades (et jamais dans les feuilles saines) à une concentration très variable (allant de l'état de traces à de très fortes concentrations); cette

---

Planche 1 - Modifications anatomiques induites par *D. teres* souche (R_3) sur le limbe d'orge seul (2); ou "préinoculé" 72h auparavant par le filtrat de S_{10} à 50% (3).

Plate 1 - Responses of barley leaf tissue infected with *D. teres* strain R_3 (2) preinoculated 72h earlier with S_{10} filtrate.

1) Coupe transversale dans une feuille d'orge: - épiderme supérieur (ES) - épiderme inférieur (EI) - mésophylle (MES) - gaine périvasculaire externe (PVE).
2) Coupe transversale dans une feuille d'orge infectée par *D. teres* souche R_3. On observe une lyse cellulaire entraînant la formation de lacunes dans le mésophylle et une altération des cellules de la gaine périvasculaire externe.
3) Coupe transversale dans une feuille d'orge infectée par la souche R_3 et préinoculée 72h auparavant par le filtrat de S_{10} à 50%. On observe quelques altérations formant de petites lacunes dans le mésophylle (3).

application préventive du filtrat de S_{10}	Concentration	% de feuilles malades	séverité del'attaque sur la 2ème feuille
24 heures	10%	59,9 ab	5,86 ab
	25%	63,3 ab	5,52 ab
72 heures	10%	49,9 bc	4,86 bc
	25%	33,4 c	3,98 cd
Temoin		79,2 [redacted]	6,22 [redacted]

Tableau 1 - Agressivité de *D. teres* (R_3) sur plantules d'orge (Var. Thibaut) stade 3 feuilles, prétraitées par le filtrat brut toxique dilué de la souche S_{10}.

Table 1 - Effect of preventive applications of strain S_{10} filtrates on the reduction of leaf lesion by *D. teres* strain R_3.

- Essai effectué en serre: Lumière: 12h/j. T°: 15-18°C, avec 4 répétitions de 10 plantes réparties en pots [redacted] polychlorure de vinyl. Observations effectuées 15j après la dernière application de R_3. Contamination artificielle: 10^6 fragments/ml.
- La sévérité de l'attaque est fondée sur la moyenne des notations réalisées sur la 2ème feuille d'après une échelle de notation de 0 à 9.
- Les données sont transformées en arc sinus $(\%)^{1/2}$.
- (*) Les valeurs accompagnées de la même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil de 5% (Test de Newman - Keuls).

variabilité étant due vraisemblablement à la dégradation des toxines durant le développement de la maladie (Barrault, 1989)

D'après les travaux de Barrault (1989) sur le pouvoir "nécrogène" des filtrats de différentes souches de *D. teres*, on peut penser que le filtrat toxique de la souche S_{10} de l'hôte peut induire la formation de "substances" dont l'interférence avec une éventuelle liaison toxines-récepteur(s) membranaire(s) pourrait aboutir à l'absence de

réponse de l'hôte vis-à-vis du complexe toxique du pathogène. On peut envisager également que ces substances puissent agir directement sur le complexe toxique de R_3, en le détoxifiant.

Nous avons montré que l'emploi d'une souche hypoagressive ou du filtrat toxique provenant de celle-ci réduit significativement la sévérité de la maladie sur le limbe foliaire.

La méthode de lutte biologique par application d'antagonistes fongiques et/ou bactériens et/ou de souches hypoagressives doit être prise en compte dans une composante de lutte intégrée. Elle devrait pouvoir judicieusement compléter l'action d'une lutte chimique, alors plus modérée, et de façons culturales idoines, susceptibles de réduire la pression d'inoculum du pathogène sans gêner (ou mieux exacerber) le développement des antagonistes et/ou des souches hypoagressives appliquées.

BIBLIOGRAPHIE

ANAGNOSTAKIS S.L. and DAY P.R., 1979 - Hypovirulence conversion in *Endothia parasitica. Phytopathology* 69: 1226-1229.

BARRAULT G., 1989 - L'helminthosporiose de l'orge causée par *Drechslera teres*. Thèse Doctorat d'Etat. I.N.P. E.N.S.A. Toulouse, France. 435p.

GRENTE J. et SAURET S., 1969 - L'hypovirulence "exclusive" phénomène original en pathologie végétale. *Compt. Rend. Hebd. Séances Acad. Sci.* 268: 3173-3176.

JAYNES R.A. and ELLISTON J.E., 1980 - Pathogenicity and canker control by mixtures of hypovirulent strains of *Endothia parasitica* in American Chestnut. *Phytopathology* 70: 453-456.

JORDAN V.W.L. and BEST G.R., 1981 - Evaluation of fungicide treatment for control of barley net blotch caused by *Pyrenophora teres*. Proc. British Crop Protection Conf.. *Pest and Diseases* 1: 249-258.

KUHLMAN E.G., BHATTACHARYYA H., NASH B.L., DOUBLE M.L and MAC DONALD W.L., 1984 - Identifying hypovirulent isolates of *Cryphonectria parasitica* with broad conversion capacity. *Phytopathology* 74: 676-682.

LEMAIRE J.M., DOUSSINAULT G., LUCAS P. et PERRATON B., 1982 - Possibilité de sélection pour l'aptitude à la prémunition dans le cas du piétin échoudage *(Gaeumannomyces graminis). Agronomie* 3: 90.

LEROUX P., 1991 - Résistance des champignons phytopathogènes aux fongicides. *Phytoma* 434: 20-26.

LITTLEFIELD L.J., 1969 - Flax rust resistance induced by prior inoculation with an avirulent race of *Melampsora lini. Phytopathology* 59: 1323-1328.

MAS P.M., 1967 - Protection du melon contre la fusariose par injection de la plantule avec d'autres souches de *Fusarium. Compt. Rend. Séances Acad. Agric. France.* 63: 1034-1046.

MATTA A., 1966 - Immunizanta di alcuni micromicieti verso le infeczioni di *Fusarium oxysporium f lycopersici* su pomodono. *Ann. Fac. Sci.. Univ. Torino* 3: 85-96.

MOSTAFA M., 1982 - Recherches sur la lutte biologique contre l' *Helminthosporium teres*, parasite de l'orge *(Hordeum sativum)* par l'utilisation de microorganismes antagonistes et d'une souche hypoagressive. Thèse Docteur Ingénieur, I.N.P. Toulouse, France 159p.

OGAWA K. and KOMADA H., 1984 - Biological control of *Fusarium* wilt of sweet potato by non pathogenic *Fusarium oxysporum. Ann. Phytopathol. Soc. Japan* 50: 1-9.

PURKAYASTHA R.P., 1989 - Modern approaches to biocontrol of crop pathogens and their implications. *Indian J. Mycol. Res.* 27: 1-6.

SHERIDAN J.E. and GRABAVAC N., 1985 - Cultivar differences in response to triadimenol seed treatment for control of barley net blotch caused by *Pyrenophora teres*. *Pl. Disease* 69: 77-80.

SMEDEGARD-PETERSEN V., 1977 - Isolation of two toxins produced by *Pyrenophora teres* and their significance in disease development of net spot blotch of barley. *Physiol. Pl. Path.* 10: 203-211.

SPURR H.W. JR., 1977 - Protective application of conidia of nonpathologenic *alternaria* sp. isolates for control of tobacco brown-spot disease. *Phytopathology* 67: 128-132.

SY A.A., ALBERTINI L., MOLETTI M. and HAMANT CL., 1991 - Mécanismes potentiels régissant le contrôle biologique des agents phytopathologiques *Cryptogamie, Mycol.* 12: 133-147.

TIVOLI B., LEMAIRE J.M. et JOUAN B., 1974 - Prémunition du blé contre *Ophiobolus graminus* Sacc. par souches peu agressives du même parasite. *Ann. Phytopathol.* 6: 395-406.

TOUBIA-RAHME H., 1982 - Effet de l'environnement chimique sur le développement de *Drechslera teres* (Sacc) Shoem parasite de l'orge. Thèse Doctorat de l' I.N.P. Toulouse, France 106p.

ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE

MOSER M. & JÜLICH W., unter von FURRER-ZIOGAS C., 1993 - Farbatlas der Basidiomyceten. Colour Atlas of Basiomycetes, 11. Stuttgart, Gustav Fischer Verlag, 13 diagnoses de genres, 60 pl. phot. col. ISBN 3-437-30733-9. ISSN 0177-9508.

Toujours selon les critères de présentation qui lui sont propres, l'Atlas en couleurs des Basidiomycètes poursuit sa publication commencée en 1985. Dans cette onzième livraison sont proposées, en allemand mais avec traduction en anglais, français et italien, les diagnoses des genres de *Tricholomatales* et *Agaricales: Mniopetalum, Nyctalis, Panellus, Phaeocollybia, Pholiotina, Pluteus, Porpoloma, Psathyrella, Resupinatus, Rickenella, Rozites, Strobilurus* et *Tricholomopsis.*

On y trouve par ailleurs la reproduction photographique en couleurs de basidiocarpes d'espèces appartenant aux genres précédents aussi bien que choisies parmi d'autres tels que *Marasmius, Mycena, Phyllotus, Russula* et *Tulostoma.*

Les photographies, pour la plupart, restituent fidèlement les caractéristiques des basidiocarpes dont des spécimens jeunes ou en coupe sont joints aux exemplaires développés. Elles seront donc d'une certaine utilité pour les identifications qui devront évidemment être précisées à l'aide de la description des espèces. Enfin, des index récapitulatifs permettent d'estimer l'importance déjà atteinte pat cet Atlas.

J. Perreau

Commission paritaire 16-1-1986 - N° 58611 - Dépôt légal 3e trimestre 1993 - Imprimerie F. Paillart
Sortie des presses le 30 septembre 1993 - Imprimé en France
Éditeur : A.D.A.C. (Association des Amis des Cryptogames)
Président : R. Baudoin ; Secrétaire : D. Lamy
Trésorier : J. Dupont ; Directeur de la publication : H. Causse

CRYPTOGAMIE

LE PÉRIODIQUE FRANÇAIS CONSACRÉ A LA CRYPTOGAMIE

CRYPTOGAMIE est un périodique édité par l'A.D.A.C. (Association des Amis des Cryptogames), dont le siège est au Laboratoire de Cryptogamie du Muséum National d'Histoire Naturelle. Les chercheurs de tous pays y publient leurs travaux en français, allemand, anglais, espagnol et italien, après accord des Comités de Lecture constitués de spécialistes de réputation internationale.

CRYPTOGAMIE propose trois sections:

Cryptogamie, Algologie
Cryptogamie, Mycologie
Cryptogamie, Bryologie-Lichénologie

Chaque section publie 4 numéros par an (tirage: 450 exemplaires).

THE FRENCH JOURNAL DEVOTED TO CRYPTOGAMY

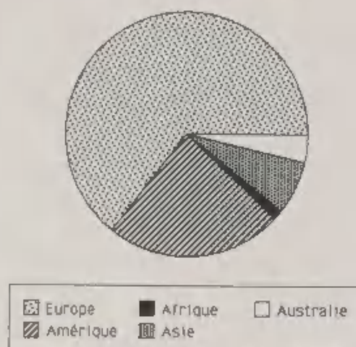
CRYPTOGAMIE is a periodical published by A.D.A.C. (Association des Amis des Cryptogames), settled at Laboratoire de Cryptogamie, Muséum National d'Histoire Naturelle. Research workers from the whole world publish their papers in French, German, English, Spanish and Italian, after acceptation by a selection commettee that comprises experts of international renown.

CRYPTOGAMIE offers to its subscribers three sections:

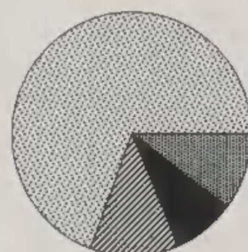
Cryptogamie, Algologie
Cryptogamie, Mycologie
Cryptogamie, Bryologie-Lichénologie

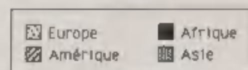
Each section publishes 4 numbers a year (printing: 450 ex.).

Diffusion de CRYPTOGAMIE

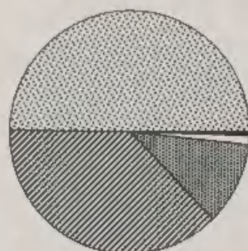


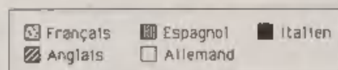
Origine des 453 articles publiés de 1986 à 1991





Répartition des articles publiés de 1986 à 1991 selon la langue





Source : MNHN, Paris

SOMMAIRE

Cryptogamie, Mycol. 1993, 14 (3): 163-240.